

ORSAY
Série A, N°
N° d'Ordre 66

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES-PHYSIQUES

PAR

Mme NICOT née GUTTON Claude

1^{re} THÈSE — La Synthèse des peptides symétriques de l'acide
meso - α , α' - Diaminopimélique et préparation
stéréospécifique de peptides non symétriques par
l'action de peptidases.

2^e THÈSE — Propositions données par la Faculté.

Soutenues

1964

devant la Commission d'examen.

MM. LEDERER

} *Président*

CHAPEVILLE

} *Examineurs*

COHEN

ORSAY

Série A, N°

N° d'Ordre 66

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES-PHYSIQUES

PAR

Mme NICOT née GUTTON Claude

1^{re} THÈSE — La Synthèse des peptides symétriques de l'acide *meso* - α , α' - Diaminopimélique et préparation stéréospécifique de peptides non symétriques par l'action de peptidases.

2^e THÈSE — Propositions données par la Faculté.

Soutenues

devant la Commission d'examen.

MM. LEDERER

CHAPEVILLE

COHEN

} *Président*

} *Examineurs*



JANVIER 1964

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	SOLEILLET	T	Physique (PCB).
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparée.	FORTIER	T	Mécan. Exp. des Fluides.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	PETIT	T	Biologie maritime.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	QUENEY	T	Météor. et dynamique atmosphérique.
WYART	T	Minéralo. et Cristal.	GALLIEN	T	Embryologie.
TEISSIER	T	Zoologie.	EICHHORN	T	Botanique.
MANGENOT	T	Biol. Végét. (Orsay).	DE CUGNAC	T	Biologie Vég. (SPCN).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.	Mlle CAUCHOIS	T	Chimie Physique.
MONNIER	T	Physiologie générale.	THELLIER	T	Physique du globe.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	L'HÉRITIER	T	Biol. générale (Orsay).
ROCARD	T	Physique (ENS).	GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
CARTAN	T	Mathématiques (ENS).	PONCIN	T	Mécanique générale.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	DUBREIL	T	Arithm. et Théorie des Nombres.
FAVARD	T	Géométrie supérieure	QUELET	T	Chimie organique.
COULOMB	T	Physique du globe.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
Mlle COUSIN	T	Biol. animale (SPCN).	CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
DRACH	T	Zoologie.	JUNG	T	Géologie.
KASTLER	T	Physique (ENS).	TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
EPHRUSSI	T	Génétique.	VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
RIVIÈRE	T	Géol. (SPCN) et Sédimentologie (Orsay).	DESTOUCHES	T	Théories physiques.
GAUTHERET	T	Biologie Vég. (PCB).	AMIEL	T	Chimie générale.
LUCAS R.	T	Recherches physiques.	HOCART	T	Minéralo. et Cristallog.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.	J.P. MATHIEU	T	Physique Optique.
ARNULF	T	Optique appliquée.	COUTEAUX	T	Cytologie.
MORAND	T	Physique Enseignement.	MAY	T	Zoologie (Orsay).
WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.	CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).	FELDMANN	T	Biologie végét. marine.
			GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)

JOST	T Physiologie comparée.	CASTAING	T Physique II Thermo. (Orsay).
FORTET	T Calcul des Probabilités et Physique mathématique.	CURIEN	T Minéralo. et Cristallog.
SCHWARTZ	T Calcul diff. et Intégral.	MOYSE	T Physiol. Végét. (Orsay).
CHOUARD	T Physiologie végétale.	NOIROT	T Evolution des Etres organ.
MALAVARD	T Aviation (Tech. Aéron.).	PANNETIER	T Chimie générale.
BRELOT	T Calcul diff. et Intégral.	POSSOMPES	T Zoologie.
NORMANT	T Synthèse organique.	PULLMANN	T Chimie quantique.
BÉNARD	T Chimie minérale.	TEILLAC	T Physique Nucl. et Radio-activité (Orsay).
BUVAT	T Botanique (ENS).	TONNELAT	T Biol. Physico-chim. (Ors.)
DUGUÉ	T Statistiques Mathém.	VILLE	T Econométrie.
SOULAIRAC	T Psychophysiologie.	WILLEMART	T Chimie (PCB).
ULRICH	T Physiol. Vég. Appliq.	DODE	T Chimie (Orsay).
MARÉCHAL	T Optique théor. et Appli.	FREYMAN	T Recherches physiques.
KIRMAN	T Théories chimiques.	GUINOCHE	T Biol. Végét. SPCN (Orsay)
CHADEFAUD	T Botanique.	ROLLET	T Chimie minérale.
Mlle LE BRETON	T Physiol. de la Nutrit.	Mlle JOSIEN	T Chimie (SPCN).
LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie.	CHEVALLEY	T Géométrie algéb. et théorie des groupes.
DEVILLERS	T Anatomie et Hist. Compar.	ARNOULT	T Electronique (Orsay).
EHRESMANN	T Topologie Algébrique.	CHAPELLE	T Physique I (Orsay).
FRANÇON	T Physique (SPCN).	DELANGE	T Mathématiques I (Orsay).
GLANGEAUD	T Géographie Phys. et Géol.	DENY	T Mathématiq. gén. (Orsay).
GODEMENT	T Mathématiques (MGP).	GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides.
PISOT	T Tech. Math. de la Phys.	LUCAS G.	T Géologie.
ROCH	T Géologie.	ALLARD	T Chimie physique.
SCHATZMANN	T Astrophysique.	BERTHELOT	T Phys. des particules fondamentales (Orsay).
TERMIER	T Géologie générale.	BRICARD	T Météorol. et Physique de l'Atmosphère.
ZAMANSKY	T Mathématiques générales.	Mme ALBE-FES-	
LENNUIER	T Physique (MGP).	SARD	T Psycho-physiol.
RIZET	T Génétique (Orsay).	FRIEDEL	T Physiq. des solides (Orsay).
ROUTHIER	T Géologie appliquée.	M. JULIA	T Etudes des Moléculaires complexes.
Mme TONNELAT	T Physique théorique.	LENDER	T Biologie animale (SPCN) (Orsay).
DIXMIER	T Mathématiques (MPC).	MAGAT	T Physico-Chimie des radio-éléments.
SOUCRAY	T Chimie générale.	Mlle QUINTIN ..	T Electrochimie.
AGRAIN	T Electrotechnique générale.	MONOD	T Chimie du métabolisme.
BRUSSET	T Chimie systématique.	BENOIT	T Physiol. animale (Orsay).
M. LEVY	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).	DE POSSEL	T Analyse numérique.
Mme CHAIX	T Chimie biologique.	CHARLOT	T Chimie analytique.
Mme HUREL-PY	T Biologie végét. (PCB).	LEMÉE	T Ecologie vég. (Orsay).
PIAUX	T Chimie (MPC).	GUÉRIN	T Chimie (MPC) (Orsay).
BRUN	T Mécanique théorique des fluides.	CHATELET M. ..	T Chimie (PCB).
LEDERER	T Chimie biolog. (Orsay).	JEAN	T Physique nucl. (Orsay).
Mme DUBREIL	T Mathématiques (Agrég.).	MATTLER	T Physique (SPCN).
Mme LELONG	T Mathématiques II (ENS).	BERGERARD	T Zoologie (Orsay).
BELLAIR	T Géologie (SPCN).	BERTEIN	T Electronique (Orsay).
COTTE	T Physique électricité.	BOUSSIÈRES	T Radiochimie.
DUBOIS J.E.	T Chimie organique.	Mme COUTURE ..	T Thermo. et Méc. physique.
LAMOTTE	T Zoologie (ENS).	ELLENBERGER ..	T Géologie des grandes régions du globe.
MICHEL A.	T Chimie minérale (Orsay).	FRANC	T Biologie animale (PCB).
OLMER	T Energétique générale.	SCHNELL	T Botanique tropicale.
ROUAULT	T Electricité (Orsay).	STOLKOWSKI ...	T Physiologie végétale.
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.		
BARCHEVITZ	T Chimie Physique.		
BROSSEL	T Physique atomique.		
BUSER	T Physiologie comparée.		
CAMUS	T Physiologie Vég. (Orsay).		

ACHER	T	Chimie biologique.	BRUHAT	T	Mathématiques (MPC).
BAUDOIN		Biologie animale (PCB).	BRUNN	T	Géologie historique (Ors.).
BEAUMONT		Biologie animale (SPCN).	CHABBAL	T	Physique (MGP) (Orsay).
BLAMONT	T	Géophysique-ionosphère.	DEHEUVELS	T	Mathématique propé.
BOURREAU	T	Botanique.	D'ESPAGNAT	T	Physique théor. (Orsay).
CURIE D.		Physique (MGP).	FURON	T	Géologie (SPCN).
DURAND-DELGA ..	T	Géologie.	Mme GANS	T	Génétique.
FRÉON	T	Chimie organique (Orsay).	GENEVES		Biologie végétale (PCB).
HELLER	T	Physiologie végétale.	GUILBERT		Physique (CUS Orléans).
TORTRAT	T	Calcul des Probabilités.	HUPE	T	Pétrographie.
CAILLEUX	T	Géologie (SPCN).	HOLLANDE	T	Biologie générale.
MAGNAN	T	Physique (SPCN).	LIONS	T	Analyse numérique.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théor. et à la Physique nucléaire.	MAITTE	T	Chimie (PCB).
			MEYER		Physique propédeutique.
			NICOLAS		Géologie appliquée.
			PANIGEL		Biologie générale.
			RAVIER		Pétrographie.
Mlle FOURCROY.		Biologie végétale (SPCN).	ROSEAU	T	Mécan. théor. des fluides.
Mme CHOQUET-	T	Mécanique analytique et	ROUBINE	T	Electronique.
BRUAT		Mécanique céleste.	SILBER	T	Chimie (PCB).
Mlle VEIL	T	Physiologie générale.	UEBERSFELD ...	T	Electronique.
LWOFF	T	Microbiologie.	YVON	T	Théories physiques.
SIESTRUNCK	T	Mécan. phys. et expérim.	HERVÉ	T	Mathématiques.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).	NERON	T	Mathémat. (MPC) (Orsay).
			Mme PECKER-		
CABANNES	T	Physique (PCB) (Orsay).	WIMEL	T	Astrophysique.
BROCHARD	T	Mécanique générale.	BALKANSKY		Physique (MPC).
LESIEUR	T	Mathématiques I (Orsay).	LE CORRE	T	Electricité.
MAZET	T	Mécan. générale (Orsay).	DELCKROIX	T	Physique théor. (Orsay).
CAIRE		Géographie physique et Géol. dynamique.	GOURDIN		Physique théor. des Hau- tes-Energies (Orsay).
			LEHMANN	T	Physique expér. des Hau- tes-Energies (Orsay).
COMOLET	T	Mécanique des Fluides.	NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
CORABŒUF	T	Physiol. animale (Orsay).			Biologie animale (PCB).
DELLOUE		Physique de l'exosphère.	ECHALIER		Physiologie cellulaire.
GORENFLOT ...		Botanique II (Orsay).	BARRAUD		Physiologie végét. (Orsay).
HOULLON		Biologie animale (PCB).	LIORET		Géologie struc. et Géolo- gie appliquée.
JULLIEN J.		Chimie (SPCN) (Orsay).	DARS		Botanique (agrégation).
MALGRANGE ...	T	Technique math. de la physique (Orsay).			Mécanique industrielle.
		Antropologie.			Electronique (Orsay).
OLIVIER					Physique théorique.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).			Chimie (CUS Orléans).
BLANC-LAPIERRE.	T	Physique (ENS) (Orsay).			Mathématique propré. (Orsay).
CHEVAUGEON ..	T	Botanique (Orsay).			Chimie propéd.
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).			Phys. expér. des Hautes- Energies (Orsay).
SAMUEL	T	Mathématiques (ENS) féminines.			Chimie (Agrég. Orsay).
					Mécanique théorique.
KOURGANOFF ..	T	Astronomie (Orsay).			
THIRY	T	Mécanique céleste.			
ABELES		Physique (SPCN).	GAUDEMAR		
AMAT	T	Physique (PCB).	PEREZ Y JORBA .		
AUBOIN	T	Géologie.			
Mme BENOIT-	T	Phys. nucléaire et radio- activité (Orsay).	DAVID	T	
GUEUTAL			BROUSSE	T	
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).			

Le Secrétaire général

R. POULLAIN

*Que Monsieur le Professeur
E. Lederer trouve ici l'expression
de ma vive reconnaissance pour
le soutien qu'il m'a toujours
accordé au cours de ce travail.*

*A Monsieur le Docteur
E. Bricas, je tiens à exprimer
toute ma gratitude pour m'avoir
initiée aux techniques de syn-
thèse des peptides et orientée
dans mon travail.*

NOMENCLATURE et ABRÉVIATIONS

de l'acide α , α' - diaminopimélique et de ses dérivés :

(Extrait de : E. BRICAS, communication polycopiée
adressée aux spécialistes des peptides, Janvier 1961).

Nous avons utilisé l'abréviation « DAP » pour désigner l'acide α , α' -diaminopimélique car c'est celle qui est la plus généralement employée par les biochimistes et les bactériologistes.

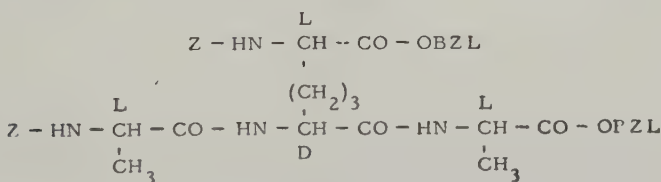
Pour désigner les formes inactives *racémique* et *meso*, on rencontre dans la littérature des notations qui ne sont pas sans équivoque : le préfixe L, D a été utilisé pour la forme *meso* [53] et le préfixe DL pour la forme *racémique* [62].

Les mêmes auteurs, pour désigner un dérivé non symétrique de la forme *meso*, ont utilisé la notation : « L-Diaminopimelic acid-D-monoamide » au lieu de *meso*-Diaminopimelic acid D-monoamide.

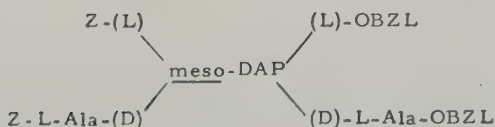
Pour éviter toute confusion, il est souhaitable de réserver le préfixe DL exclusivement pour la forme racémique et d'utiliser le préfixe *meso* non seulement pour l'acide inactif par compensation intramoléculaire mais aussi pour ses dérivés.

La nomenclature des dérivés non symétriques du *meso*-DAP pose un problème : pour désigner sur lequel des deux carbones asymétriques se trouvent les fonctions substituées, nous proposons la notation (L) ou (D) placée immédiatement avant l'abréviation « *meso*-DAP » pour les dérivés de la fonction amine, ou après celle-ci pour les dérivés de la fonction carboxyle. Pour désigner par exemple le dérivé dont la structure est représentée sur la figure 0 (a), nous employons la notation : diester benzylique du Z-(L), Z-L-Ala-(D) *meso*-DAP (D)-L-Ala ou l'abréviation représentée sur la figure 0 (b).

FIGURE 0



(a)



(b)

Pour les abréviations des acides aminés habituels, nous avons utilisé le système introduit par BRAND et EDSALL [143] c'est-à-dire les trois premières lettres de l'acide aminé. Les abréviations employées pour les dérivés peptidiques sont celles du Comité de la nomenclature du V^e Symposium Européen sur les peptides [144].

Z : benzyloxycarbonyl ou carbobenzoxy.
 OMe : méthyl ester.
 OBZL : benzyl ester.

Autres abréviations utilisées :

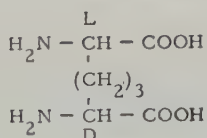
DCC I : dicyclohexylcarbodiimide.
 DCC U : dicyclohexylurée.
 tris : tris (hydroxyméthyl) aminométhane.
 LAP : leucine aminopeptidase.

Introduction

L'acide α, α' -diaminopimélique est un **acide aminé propre aux bactéries** [1, 2] : il n'existe ni chez les organismes supérieurs ni chez aucun autre microorganisme *. Il a été découvert simultanément par WORK [3, 4] à partir de *Corynebacterium diphtheriae* et par ASSELINEAU et LEDERER [5, 6] à partir des Cires D de *Mycobacterium tuberculosis*. C'est la comparaison du produit naturel avec le produit de synthèse, obtenu en 1908 par SÖRENSEN [7] qui a permis son identification [8].

Comme le montre la formule ci-dessous, l'acide α, α' -diaminopimélique (DAP) est un acide diaminé dicarboxylique en C_7 (figure 1). Il possède deux carbones asymétriques et peut donc se trouver sous plusieurs formes stéréoisomères : la forme D, D et L, L ainsi que la forme *meso*, optiquement inactive par compensation intramoléculaire. C'est la forme *meso* qu'on rencontre le plus souvent chez les bactéries [1, 9].

FIGURE 1



Acide α, α' -diaminopimélique

Dans le présent travail, nous exposerons la synthèse de peptides du *meso*-DAP. C'est la première fois que sont décrites des synthèses de peptides du DAP ainsi que des synthèses de peptides contenant un acide diamino-dicarboxylique de configuration *meso*. Cette étude a donc un intérêt en tant que solution fournie à un problème de synthèse peptidique ; par conséquent, nous présenterons dans cette introduction la contribution apportée par notre travail à ce problème de synthèse, avant d'attirer l'attention sur l'intérêt considérable qu'offrent les **peptides naturels de cet acide aminé**.

(*) Il existe aussi chez certains Myxophycées, algues bleu-vert, de structure très proche des bactéries.

Le DAP possédant deux fonctions amines et deux fonctions carboxyles symétriques, des groupements ou des dérivés d'acides aminés peuvent être introduits simultanément sur ses deux fonctions amines ou carboxyles ; on obtient alors des **dérivés ou peptides symétriques** du *meso*-DAP. Les problèmes posés par la synthèse de vingt-quatre de ces dérivés peptidiques ou peptides symétriques, préparés pour la première fois, et le choix des méthodes employées sont exposés dans la partie générale (chapitre I). Les détails de leurs synthèses et leurs caractéristiques se trouvent dans la partie expérimentale correspondante.

Lorsqu'on envisage la synthèse de **peptides non symétriques** — c'est-à-dire de peptides ayant une seule des fonctions amines (ou une seule des fonctions carboxyles) du DAP liée à un acide aminé ou ayant leurs deux fonctions amines liées à des acides aminés différents — on s'aperçoit que la configuration *meso* du DAP entraîne des problèmes particuliers. Il existe en effet, pour tous les peptides non symétriques de cet acide aminé, deux formes isomères suivant la position de la liaison peptidique par rapport au carbone L ou au carbone D. Dans le *meso*-DAP, rien au point de vue chimique, à part cette présence en α d'un carbone L ou d'un carbone D, ne distingue les deux fonctions amines (ou carboxyles) ; par conséquent, il ne semble pas possible, dans l'état actuel de nos connaissances, de faire la synthèse de peptides non symétriques de configuration stéréochimique déterminée, directement à partir du *meso*-DAP.

Par contre, les enzymes protéolytiques sont des agents biochimiques qui, lors de leur action hydrolytique, permettent de distinguer entre ces liaisons peptidiques en α d'un carbone L ou d'un carbone D. Leur stéréospécificité nécessite, en général, la présence de deux carbones L en α de part et d'autre de la liaison peptidique. Nous avons pensé pouvoir obtenir des peptides non symétriques du *meso*-DAP de structure et de configuration déterminées par hydrolyse, dans les peptides symétriques, de la liaison peptidique située entre deux carbones L.

Le **comportement de ces peptidases** vis-à-vis des peptides de l'acide *meso*-DAP n'a pas encore été déterminé. C'est pourquoi, dans le chapitre II de la partie générale, nous étudierons la spécificité structurale et stérique de la **carboxypeptidase A** du pancréas, de la **leucine aminopeptidase** du rein de porc et de la **pronase**, enzyme bactérien isolé à partir de *Streptomyces griseus*, vis-à-vis des peptides symétriques que nous avons préparés. La détermination de cette spécificité a nécessité, dans chaque cas étudié, la mise au point des conditions de l'hydrolyse ainsi que celle de méthodes variées qui permettent non seulement de suivre cette hydrolyse en fonction du temps mais de séparer les composants de l'hydro-

lysats ; ces composants ont été par la suite isolés et caractérisés. Dans la partie expérimentale, nous donnerons la description de la préparation par cette méthode de huit dérivés peptidiques et peptides non symétriques.

Les peptides non symétriques obtenus par l'action de ces enzymes, présentent une structure et une configuration caractéristiques ; mais les possibilités d'obtenir une grande variété de ces propriétés sont limitées par le principe même de leur préparation. Cette méthode, par exemple, ne permet pas de préparer des peptides dont la liaison non symétrique avec un acide aminé est en α du carbone L du *meso*-DAP. Cependant, dans leur molécule, ces peptides ne possèdent plus des fonctions amines et carboxyles parfaitement identiques ; en utilisant cette légère différence, nous avons pu mettre au point une méthode chimique permettant, à partir de ces peptides non symétriques, d'obtenir d'autres peptides non symétriques de structure et de configuration plus variées. La description de cette méthode, la vérification de son efficacité et les possibilités d'application seront exposées dans le chapitre III de la partie générale. Les quatre dérivés et peptides préparés de cette façon sont décrits dans la partie expérimentale *.

Pour la première fois des peptides symétriques et même non symétriques du *meso*-DAP ont donc été obtenus **par synthèse**. En outre, les méthodes mises au point pour leur préparation rendent possible l'acquisition de structures très variées. Mais c'est en considérant les peptides naturels du *meso*-DAP que l'on peut évaluer tout l'intérêt que présente la synthèse de ces structures particulières. **L'importance biochimique et immunologique** de ces peptides a été mise en évidence par deux séries de travaux, menées en parallèle ces dernières années, d'une part sur les parois bactériennes et d'autre part sur les cires D isolées à partir des *Mycobactéries*.

Dès 1953 [10], les travaux entrepris sur la **paroi bactérienne** ont permis d'y localiser le DAP [11, 12, 13]. Les parois jouent un rôle primordial dans la vie des bactéries car elles leur donnent leur forme et leur permettent de maintenir leur intégrité ; en l'absence de ce constituant cellulaire, la membrane cytoplasmique trop mince, ne peut supporter la pression osmotique du milieu interne et la bactérie se lyse. On a très vite pu déterminer que cette rigidité était due à la présence d'un composant spécifique de la paroi appelé mucopeptide [2, 14] car les facteurs de la lyse bactérienne (lysozymes, antibiotiques) agissent directement ou indirectement sur lui. Le mucopeptide est un hétéropolymère comportant un « tronc polysaccharidique » [15] formé par polymérisation de deux sucres

(*) Nous avons aussi étudié dans ce chapitre l'action estérasique de la trypsine et de la papaïne sur des dérivés esters du *meso*-DAP pour essayer d'obtenir un dérivé ayant un de ses carboxyles libre et l'autre estérifié.

aminés (acétylglucosamine et acide muramique acétylé) [16, 17] sur lequel se fixent d'une façon plus ou moins régulière des chaînes peptidiques identiques liées les unes aux autres. C'est dans ces chaînes peptidiques que l'on localise le DAP. Il existe le plus souvent sous sa forme *meso* mais quelquefois sous la forme L, L* ; il est accompagné en général de L- et D-alanine et d'acide D-glutamique (on peut trouver aussi du glycolle, de l'acide D-aspartique et de la sérine) **.

Ces structures osidiques et peptidiques sont tellement imbriquées l'une dans l'autre qu'il n'est pas possible de déterminer leur rôle respectif dans le maintien de la rigidité de la cellule bactérienne ***.

Parallèlement à ces études, LEDERER et coll. ont montré que certaines cires D, isolées à partir de mycobactéries, possédaient l'**effet adjuvant** de FREUND [25] — c'est-à-dire qu'injectées à un animal en même temps qu'un antigène, elles provoquent une forte augmentation du taux d'anticorps formés. — Cet effet semble lié à la présence de *meso*-DAP sous forme de peptide [26, 27]. Après la mise en évidence de *meso*-DAP [5, 6], puis d'acides aminés de configuration D dans ces cires [28], la découverte de l'existence d'acide muramique [29, 30] fait supposer que, dans les bactéries entières, ces cires font partie de la paroi bactérienne car elles renferment à côté d'acide mycolique tous les constituants caractéristiques du mucopeptide [31, 32]. Mais, si la présence de *meso*-DAP est nécessaire à l'effet adjuvant, cette condition n'est pas suffisante : récemment WHITE et coll. ont montré, qu'en l'absence d'acide mycolique, ce caractère immunologique est aboli [27].

Il résulte de ce court exposé que les peptides naturels du *meso*-DAP présentent un intérêt incontestable tant au point de vue biochimique qu'au point de vue immunologique. La reproduction par synthèse de ces structures peut s'avérer, dès lors, d'une utilité certaine ****.

Il est cependant regrettable que la structure générale de la partie peptidique de ces mucopeptides soit encore mal définie. Chez certaines bactéries des enchaînements plus ou moins longs ont été caractérisés. Les

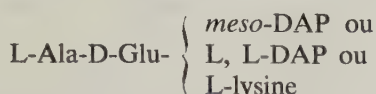
(*) Chez certaines bactéries, le DAP est remplacé par de la L-lysine.

(**) Pour plus de détails sur la structure du mucopeptide, voir les nombreuses revues d'ensemble parues à ce sujet [18 à 23].

(***) Dans de récents travaux sur la biosynthèse des parois bactériennes, STROMINGER et coll. [24] ont montré que des enzymes hautement spécifiques font d'abord la synthèse d'une chaîne peptidique de cinq acides aminés ; c'est seulement à partir de cette chaîne que la polymérisation du polysaccharide est possible.

(****) Très récemment, TESSER et NIVARD ont décrit la synthèse d'un dérivé peptidique, reproduisant un enchaînement de la partie peptidique d'un mucopeptide contenant la lysine [33].

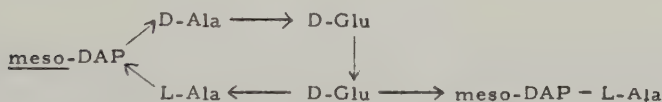
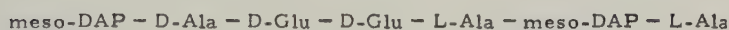
résultats obtenus semblent vouloir donner à la partie peptidique l'enchaînement



lié au carboxyle de l'acide muramique [34 à 39]. A partir de ce squelette peptidique des molécules d'alanine et de glycolle prolongeraient les chaînes. Il se formerait des ponts entre la fonction $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine ou du DAP et un carboxyle dont la nature n'est pas encore déterminée [15, 40, 41]; ces ponts peuvent se faire directement entre ces fonctions [42] ou par l'intermédiaire de résidus de glycolle [43] ou encore d'alanine [37].

JOLLÈS et coll. attribuent à la partie peptidique des cires D, isolées à partir de *Mycobacterium tuberculosis*, souche Brévannes l'une ou l'autre des séquences en acides aminés de la figure 2 [44].

FIGURE 2



Structures possibles de la partie peptidique des Cires D

On remarque que dans ce peptide on ne retrouve pas l'enchaînement en acides aminés que laissent supposer les études faites sur les mucopeptides.

Nous voyons ainsi que les séquences en acides aminés des mucopeptides ne sont pas entièrement déterminées et, lorsqu'elles le sont, la nature de certaines liaisons n'est pas encore établie : liaisons α ou γ de l'acide glutamique * [46], liaisons en α du carbone L ou D du meso-DAP. Actuellement, les données sur la structure des peptides du meso-DAP ne sont pas suffisantes pour permettre de les reproduire par synthèse. Cependant notre travail peut aider à élucider quelques problèmes de structure.

Les peptides obtenus par hydrolyse partielle des mucopeptides peuvent être caractérisés par comparaison avec les peptides préparés par

(*) STROMINGER [45] a trouvé une liaison γ entre le D-glu et la L-lys.

synthèse. L'action sur les peptides des peptidases dont nous avons étudié la spécificité, peut permettre de déterminer la nature des liaisons peptidiques avec le *meso*-DAP. Nous exposerons au cours de notre travail les possibilités que nous apportons de préciser la structure de ces peptides.

D'autre part, ces dernières années, quelques peptidases spécifiques des mucopeptides ont été isolées [42, 47] ; les peptides dont nous avons fait la synthèse pourraient permettre de déterminer leur spécificité structurale et stérique : la nature des liaisons hydrolysées par ces enzymes dans les peptides naturels serait ainsi élucidée. Ajoutons encore que les peptides synthétiques peuvent aussi servir à détecter dans les bactéries d'autres peptidases et même à vérifier la pureté des enzymes utilisés lors de l'étude de la structure du mucopeptide [48, 40] et qui agissent sur la partie osidique.

Pour conclure cette introduction nous dirons que notre travail contribue non seulement à élucider un problème de synthèse de peptides possédant un intérêt biochimique et immunologique, mais il donne aussi la **possibilité de préciser certaines structures de ces mêmes peptides.**

PARTIE GÉNÉRALE

CHAPITRE PREMIER

Synthèse de Peptides Symétriques du *meso* - DAP

A - INTRODUCTION

Le peptide isolé à partir des cires D d'une souche humaine de *Mycobacterium tuberculosis* [44], de même que les peptides provenant de la paroi d'autres bactéries [18 à 23] comportent, comme nous l'avons vu précédemment, toujours des résidus de L- et de D-alanine et d'acide D-glutamique en liaison peptidique soit avec le *meso*-DAP, soit entre eux. Nous étions ainsi amenés à préparer des peptides symétriques contenant le *meso*-DAP en position C-terminale, N-terminale ou intermédiaire en liaison avec ces acides aminés. Ce sont les peptides suivants :

- bis(L-alanyl)-*meso*-DAP (I)
- bis(D-alanyl)-*meso*-DAP (énantiomorphe du précédent)
- meso*-DAP-bis(L-alanine) (II)
- meso*-DAP-bis(D-alanine) (énantiomorphe du précédent)
- bis(L-alanyl)-*meso*-DAP-bis(L-alanine) (III)
- bis(α -L-glutamyl)-*meso*-DAP (IV)*
- meso*-DAP-bis(α -L-glutamyl-D-alanine) (V)**

Leurs formules sont données dans la figure 3.

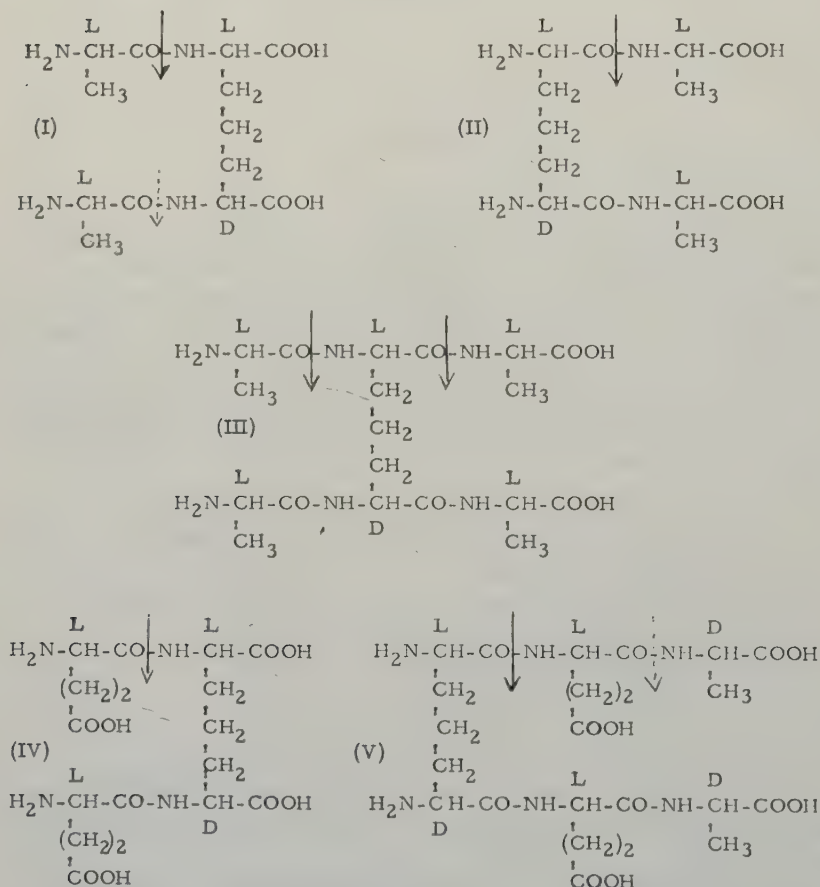
Nous rappellerons, dans un bref aperçu, les étapes nécessaires à toute synthèse peptidique. Ces données sont de plus résumées dans le schéma I.

(*) L'acide glutamique existe dans les mucopeptides sous la forme D et non pas L ; cependant les liaisons peptidiques entre l'acide D-glutamique et le *meso*-DAP n'étant pas susceptibles d'être hydrolysés ultérieurement par les enzymes que nous avons utilisés ,nous avons préféré faire la synthèse de peptides avec l'acide L-glutamique ; nous avons ainsi obtenu par la suite des peptides non symétriques énantiomorphes des peptides qui peuvent se trouver dans la nature.

(**) La synthèse de ce peptide a été effectuée au laboratoire suivant nos indications par Pierre LEFRANCIER ; la description de cette synthèse est présentée dans sa thèse [46].

1. Un acide aminé ayant une structure bifonctionnelle, il est nécessaire, dans une première étape, d'empêcher temporairement de réagir les fonctions qui ne participent pas à la liaison peptidique — c'est-à-dire l'amine de l'acide aminé dont le groupement carboxylique est impliqué dans la liaison peptidique et le carboxyle de l'acide aminé dont le groupement est impliqué dans cette liaison. — Ces fonctions sont donc masquées par des groupements appelés protecteurs.

FIGURE 3



Peptides du meso-DAP, de la L-alanine et de l'acide L-glutamique, préparés par synthèse

Action de la leucine aminopeptidase sur ces peptides :

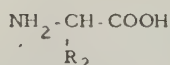
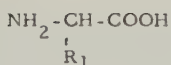
— liaisons hydrolysées facilement ;

- - - liaisons hydrolysées lentement.

SCHÉMA I

La synthèse peptidique

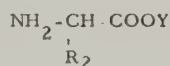
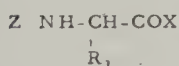
Schéma de la synthèse peptidique



Protection des groupements fonctionnels



Activation du carboxyle



+

Couplage



(III)

Elimination des groupements protecteurs

(I)

↓ (II)



Z : groupement protecteur de la fonction amine.

Y : groupement protecteur de la fonction carboxyle.

X : groupement activateur de la fonction carboxyle.

R₁, R₂ : chaînes latérales.

2. Les fonctions carboxyles et amines qui doivent participer à la liaison peptidique ne sont pas suffisamment réactives pour faire d'elles-mêmes la liaison-CO-NH-. Il faut donc activer l'une d'entre elles dans une deuxième étape.

3. Dans une troisième étape, le dérivé activé est mis en présence de son partenaire pour la réaction de condensation : c'est le couplage proprement dit.

Ces deux dernières opérations peuvent se faire en une seule étape en employant un réactif déshydratant (ex. dicyclohexylcarbodiimide) qui, mis en présence des deux partenaires, provoque la réaction de condensation.

4. Si la synthèse peptidique est arrêtée au stade du dipeptide, on élimine tous les groupements protecteurs (voie I), mais si elle doit être continuée par l'extrémité N-terminale ou C-terminale, on élimine sélectivement les groupements protecteurs de la fonction amine (voie II) ou carboxyle (voie III).

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses revues d'ensemble développant les problèmes généraux de la synthèse peptidique ; nous ne citerons ici que la « mise au point » de E. BRICAS [49] ainsi que le gros ouvrage de GREENSTEIN et WINITZ [50]. Certaines méthodes publiées depuis 1961 sont décrites dans le récent article de WIELAND et DETERMANN [51].

On ne peut trop insister, lors des synthèses de peptides, sur la nécessité d'avoir des acides aminés purs c'est-à-dire qui ne soient pas contaminés par d'autres acides aminés ou par des isomères optiques. La L- et la D-alanine sont des acides aminés d'utilisation courante* ; il n'en est pas de même pour le *meso*-DAP dont la découverte est relativement récente. Dans le commerce il n'existe qu'accompagné d'un peu de forme L, L et de lysine.

Après une recristallisation suivant GILVARG [52], nous avons obtenu du *meso*-DAP dépourvu de lysine et dont la pureté stéréochimique a pu être vérifiée de la façon suivante : la diamide, préparée à partir de cet acide, a été soumise à l'hydrolyse stéréospécifique de l'aminocidase du rein de porc suivant WORK et coll. [53]. L'hydrolysate obtenu est alors composé uniquement de monoamide (provenant de l'hydrolyse de la fonction amide en α du carbone L du *meso*-DAP) et il n'y a pas de DAP libre (qui proviendrait de l'hydrolyse des deux fonctions amides de la forme L, L) ni de diamide (provenant du diamide du D, D-DAP non hydrolysé). Le *meso*-DAP, utilisé dans nos synthèses, est donc parfaitement pur.

B - CHOIX DES DÉRIVÉS ET DES MÉTHODES DE COUPLAGE

Lorsque l'on considère le rôle des peptides symétriques du *meso*-DAP dans notre travail, en tant que substrats d'enzymes stéréospécifiques, l'im-

(*) Il faut noter cependant qu'il nous a été difficile d'avoir de la L-alanine possédant un pouvoir rotatoire convenable : le Professeur L. ZERVAS nous en a aimablement fourni ; certains lots de la Maison Mann se sont montrés satisfaisants.

portance au cours de leur synthèse du maintien de la configuration optique des acides aminés composants devient évidente. Notre choix sera donc guidé par cette nécessité et, dans le cadre des possibilités ainsi fixées, nous déterminerons la méthode susceptible de donner les meilleurs résultats.

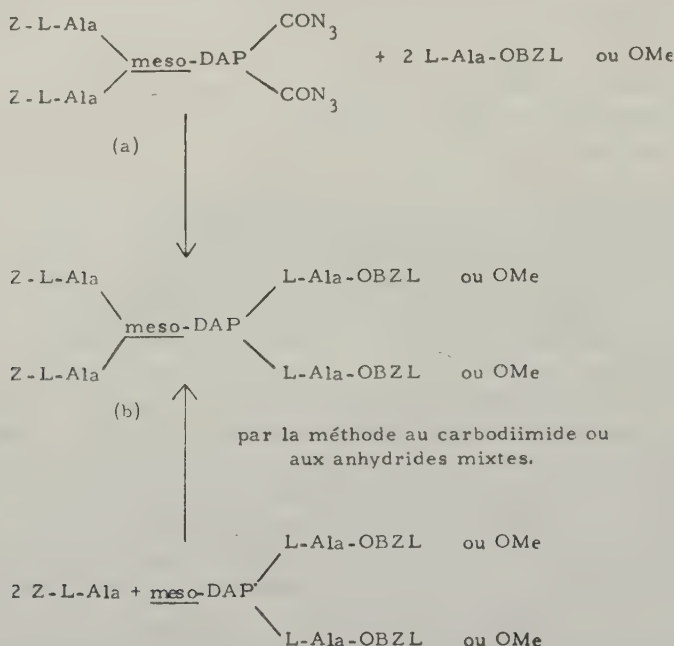
Au cours des différentes étapes de la synthèse d'un peptide, les **dangers de racémisation** dépendent beaucoup de la nature des groupements protecteurs de la fonction amine : dans le cas où ce groupement est, par exemple, le carbobenzoxy (Z), l'acide aminé ainsi protégé n'est pas racémisé dans les conditions où par exemple les acides aminés acétylés ou benzoylés le sont entièrement [54]. Aussi avons-nous choisi le carbobenzoxy comme groupement protecteur temporaire de la fonction amine. Dans le cas de la synthèse des peptides (I), (II) et (IV), l'activation des acides aminés carbobenzoxylés peut donc être faite, sans aucun risque de racémisation, par la plupart des méthodes. Nous avons essayé la méthode aux anhydrides mixtes avec les chlorocarbonates d'alcoyles [55 a] et la méthode aux dicyclohexycarbodiimides (DCCI) [56]. Pendant les couplages, la protection de la fonction carboxyle était assurée par des esters méthyliques ou benzyliques. L'obtention du peptide libre, par élimination des groupements protecteurs des deux fonctions amines et carboxyles, est possible en une seule opération dans le cas de l'hydrogénation des esters benzyliques. Les possibilités d'élimination sélective des groupements protecteurs de la fonction amine, pour la prolongation de la chaîne peptidique du côté N-terminal, seront examinées ultérieurement.

Par contre, lors de l'activation du carboxyle libre d'un dipeptide carbobenzoxylé, l'acide aminé activé peut se racémiser pendant le couplage et le pourcentage de cette racémisation dépend de la méthode d'activation utilisée, de la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé activé [57] et du solvant employé [57, 55 b]. Dans ce cas, la méthode aux anhydrides mixtes est à exclure et même la méthode aux carbodiimides ne se fait pas sans risques ; seule la méthode aux azides [58] ne provoque aucune racémisation.

Pour obtenir le pentapeptide (III) nous ne pouvons retenir, en nous basant sur ces considérations, que deux schémas de synthèse : suivant le schéma II (a), le Z-tripeptide — de l'extrémité N-terminale — ne peut être couplé avec un ester de l'alanine que par la méthode aux azides ; mais, suivant le schéma II (b), nous pouvons coupler la Z-alanine avec un ester du tripeptide — de l'extrémité C-terminale — par la méthode au DCCI et aux anhydrides mixtes.

SCHÉMA II

Possibilités de synthèse du pentapeptide bis(L-Ala)-meso-DAP-bis(L-Ala)



La première méthode [schéma II (a)] implique la transformation d'un diester protégé du *meso*-DAP en dihydrazide puis en diazide. Avant d'effectuer ces synthèses sur un dérivé tripeptidique, nous avons préféré faire un essai préalable avec les dérivés correspondants du bis-*Z-meso*-DAP et coupler son azide avec l'ester benzylique de la L-alanine. Le produit obtenu dans ce cas peut se comparer avec le dérivé peptidique obtenu précédemment par la méthode au DCCI et aux anhydrides mixtes. Dans le cas du bis-*Z-meso*-DAP comme dans le cas du *Z*-tripeptide, la transformation de l'ester en hydrazide donne lieu à des réactions secondaires ; en effet, à partir de l'hydrazide brut, on n'obtient qu'un très faible pourcentage de produits analytiquement purs. De plus, après couplage et hydrogénation des groupements protecteurs, on peut mettre en évidence par chromatographie sur papier l'existence de plusieurs taches parasites, à côté des peptides libres [(II) ou (III)]. Pour ces raisons, nous avons renoncé à ce schéma de synthèse.

Dans le deuxième schéma [II (b)], on utilise un dérivé protégé du tripeptide C-terminal, dont on peut scinder le groupement acyle tout en conservant la liaison ester.

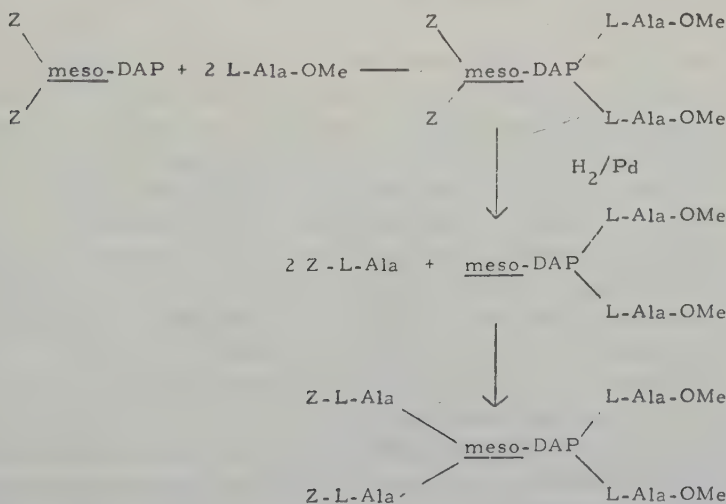
Dans le cas d'un ester benzylique, il semblait possible, suivant BEN

ISHAÏ [59, 60], de scinder le groupement carbobenzoxy par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial sans toucher la fonction ester. Mais, plus récemment, certains auteurs [61] ont signalé que l'acidolyse des groupements carbobenzoxy, dans ces conditions, s'accompagnait d'une assez forte hydrolyse de l'ester benzylique. Nous avons en effet pu vérifier que, par cette méthode, l'acidolyse du bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala-BZL) conduit à un mélange de toutes les combinaisons possibles de diesters et de monoesters du dérivé monocarbenzoxylylé.

Par contre, si la fonction carboxyle est masquée par un ester méthylique il est possible d'hydrogéner le groupement Z du bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala-OMe), tout en gardant la protection du carboxyle. Cependant les esters méthyliques des peptides (II) et (III) carbobenzoxylysés sont beaucoup moins solubles dans les solvants organiques que les esters benzyliques correspondants, ce qui écarte, pour les obtenir, certaines méthodes de couplage. Ainsi, dans la méthode au DCCI, la dicyclohexylurée — produit normal de cette méthode de couplage — est aussi très peu soluble dans les solvants organiques et il est quasiment impossible de la séparer de ces dérivés des peptides (II) et (III). Nous avons donc dû renoncer dans ce cas à appliquer la méthode au DCCI. Par contre, la méthode aux anhydrides mixtes convient parfaitement.

La synthèse du peptide (III) peut donc être résumée dans le schéma III :

SCHÉMA III
Synthèse du pentapeptide



Une saponification des diesters méthyliques, suivie alors d'une hydrogénation, permet d'obtenir le peptide libre (III).

C - DIFFICULTÉS RENCONTRÉES

Les peptides symétriques dont nous avons fait la synthèse semblent de prime abord des peptides simples, car ils ne forment pas un enchaînement en acide aminé très long et, s'il coexiste dans la molécule du *meso*-DAP quatre groupements fonctionnels, les réactions se font par contre simultanément soit sur les fonctions amines, soit sur les fonctions carboxyles. Mais la réalité s'est montrée très différente. Nous verrons ainsi que la synthèse des peptides symétriques pose des problèmes de **solubilité** et de **purification** quelquefois semblables à ceux rencontrés dans les synthèses de peptides longs et que la coexistence dans la même molécule de ces deux fonctions amines et de ces deux fonctions carboxyles entraîne des possibilités de réactions secondaires.

1. - ÉLIMINATION DES DÉRIVÉS N'AYANT PAS RÉAGI

Dans les synthèses de peptides simples, le principe général d'élimination de ces dérivés est le suivant : après concentration à sec du mélange réactionnel et dissolution du résidu dans un solvant non miscible à l'eau, on effectue des lavages avec des solutions aqueuses acides et alcalines.

Dans notre cas, nous avons rencontré des difficultés de deux sortes :

1. Les peptides protégés, issus des couplages, ne sont souvent pas ou peu solubles dans les solvants organiques non miscibles à l'eau. Il nous faut alors extraire de nombreuses fois dans des solvants chauds les produits qui n'ont pas réagi à partir du résidu obtenu par concentration à sec du mélange réactionnel.

2. Les éliminations des produits de départ se compliquent encore du fait qu'il existe, dans le milieu réactionnel à la fin des opérations, des dérivés résultant de réactions partielles, c'est-à-dire de réactions n'ayant impliqué qu'une seule des fonctions amines ou carboxyles. Ces dérivés et en particulier ceux dont un des carboxyles est encore libre ont souvent une très faible solubilité dans les solvants organiques et aussi dans les solutions aqueuses alcalines. La possibilité d'avoir de tels dérivés parmi les produits de la synthèse peut s'expliquer de trois façons :

- par une saponification partielle des diesters des dérivés carbobenzoxylés du *meso*-DAP ;
- par un couplage avec un monoester du *meso*-DAP ; l'estérification du *meso*-DAP n'avait donc pas été totale ;
- par un couplage avec un ester d'acide aminé n'impliquant qu'un seul des carboxyles du *meso*-DAP.

Il est nécessaire d'empêcher autant que possible cette formation soit en prolongeant les réactions de saponification ou d'estérification, soit lors des couplages, en employant un grand excès du dérivé de l'acide aminé partenaire du *meso*-DAP.

Ces difficultés sont tout à fait assimilables à celles que l'on rencontre

dans les synthèses de peptides longs : insolubilité des peptides protégés dans les solvants non miscibles à l'eau - insolubilité des dérivés n'ayant pas réagi dans les solutions aqueuses acides ou alcalines.

2 - POSSIBILITÉS DE RÉACTIONS SECONDAIRES

Il est certain que l'existence de quatre groupements polaires au sein d'une même molécule — que ce soit les fonctions amines et carboxyles du *meso*-DAP ou celles des acides aminés liés à celui-ci — doit permettre des réactions secondaires plus facilement que dans le cas des acides monoaminés monocarboxyliques. A l'appui de cette hypothèse, nous pouvons noter la grande instabilité à la chaleur des peptides non symétriques du *meso*-DAP : à l'état de poudre, ces peptides ne peuvent être chauffés sous vide, pour être desséchés, sans se décomposer ; ce phénomène est plus net dans le cas des peptides non symétriques du côté C-terminal du *meso*-DAP (par exemple : *meso*-DAP(D)-L-Ala). Il est à remarquer que, dans ces conditions, même le peptide symétrique bis(L-Glu)-*meso*-DAP ayant deux fonctions carboxyles supplémentaires se décompose.

Cette instabilité des peptides non symétriques, qui sont une étape obligatoire dans les réactions de synthèse symétrique, permet de supposer que les réactions secondaires se font peut-être à ce stade.

Pour mettre en évidence ces réactions secondaires et ces décompositions, nous avons chromatographié sur papier les produits obtenus et nous les avons révélés par la ninhydrine dans le cas des dérivés ayant une fonction amine libre ; dans le cas où les fonctions amines sont masquées, l'élimination préalable des groupements Z sur un échantillon est nécessaire.

Nous citons deux exemples où nous avons pu diminuer les possibilités de réactions secondaires :

— lors de l'activation des carboxyles du *meso*-DAP au moment des couplages, il est nécessaire de travailler à une température inférieure à celle employée habituellement. Un anhydride mixte du *meso*-DAP doit réagir avec un ester d'acide aminé d'abord à -10° puis à $+2^{\circ}$, et il n'est pas recommandé de porter le mélange réactionnel à 50° comme le propose VAUGHAN [55 b]. De même les couplages avec le DCCI doivent être faits de préférence à -10° au début puis à la glacière, plutôt qu'à la température ordinaire * ;

— lors de l'hydrogénation du peptide bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala-OMe) c'est-à-dire lors de la libération des fonctions amines du *meso*-DAP, il y a formation en grande quantité d'un dérivé parasite, si l'on travaille en présence d'eau et en présence d'acide acétique pour salifier les fonc-

(*) Ces constatations sont le fruit de plusieurs expériences ; il est donc possible de trouver dans la partie expérimentale la description de la préparation de certains peptides, réalisée au début de ce travail avant que nous ayons fait ces constatations.

tions amines. Si, par contre, l'hydrogénation a lieu en milieu totalement anhydre, en présence d'acide *p*-toluène-sulfonique et à froid, ce dérivé ne se forme pas. Cette possibilité d'éliminer la réaction secondaire fait penser à l'éventualité de la formation d'un cycle dicétopipérazine.

Il est possible aussi qu'en travaillant à basse température on puisse diminuer les réactions secondaires qui se font lors du traitement des esters méthyliques du *meso*-DAP par de l'hydrazine ou de l'ammoniac en milieu alcoolique anhydre pour obtenir les amides et les hydrazides.

3 - DIFFICULTÉS DE CRISTALLISATION - FORMATION DE GELS VARIATION DES FORMES SOLIDES DU MÊME DÉRIVÉ ET DES POINTS DE FUSION

Dans la plupart des solvants organiques, les dérivés peptidiques du *meso*-DAP précipitent entre chaud et froid sous forme de gels et ces précipitations n'apportent pas les purifications que l'on attend en général d'une recristallisation. Pour certains dérivés nous avons pu trouver, par tâtonnement, des solvants qui provoquent une véritable cristallisation. Exemple : l'ester benzylique du bis-*Z-meso*-DAP-bis(L- ou D-Ala), précipité sous forme de gel opalescent dans le tétrahydrofuranne, se transforme lentement à 4° en cristaux blancs (rosaces). Le point de fusion de ces cristaux est de 30° plus élevé que celui de la poudre issue du gel.

Cette variation du point de fusion suivant la forme de solidification s'est montrée encore pour d'autres dérivés. Citons le cas du peptide bis(*Z*-Ala)-*meso*-DAP. Ce dérivé dissous dans l'eau, sous forme de sel de sodium, précipite par acidification dans certains cas sous forme d'un gel volumineux et opalescent et, après essorage, la poudre obtenue fond entre 95 et 115° (forme A) ; dans d'autres cas il précipite sous forme d'un gel plus fin et blanc (forme B) et la poudre obtenue après essorage fond nettement entre 146 et 149°. La forme (B) est insoluble dans l'acétate d'éthyle anhydre mais se dissout dans ce solvant saturé d'eau. Par recristallisation dans l'acétate d'éthyle anhydre ou saturé d'eau, nous avons pu obtenir la transformation des formes (A) en (B) et (B) en (A) sans que nous puissions déterminer cependant les conditions précises d'obtention ni de (A) ni de (B). Nous avons pu exclure (voir partie expérimentale, chapitre I) qu'il s'agisse là d'un composé d'inclusion avec les métaux alcalins. Nous sommes donc encore devant le cas de deux formes de précipitation où cette fois-ci aucune ne semble vraiment cristalline, quoique la forme (B) soit très proche de cet état.

Nous avons pensé à une explication de ce phénomène qui demanderait évidemment une plus ample vérification et nous ne la donnerons ici qu'en tant qu'hypothèse. Le dérivé bis(*Z*-Ala)-*meso*-DAP peut former des liaisons hydrogènes entre ses carboxyles, réunissant ainsi un nombre plus ou moins grand de molécules entre elles suivant la formule (I) de la figure 4. Le point de fusion variable et étendu sur plus de 20° de la

forme (A) peut s'expliquer par la présence d'un mélange de ses chaînons plus ou moins longs ainsi formés. Par contre, la forme (B) tendrait vers une structure limite, représenté par la formule (II) de la figure 4 où seulement deux molécules du dérivé carbobenzoxylyé sont réunies.

L'existence de liaisons hydrogènes entre deux carboxyles, dans les cristaux formés par les acides dicarboxyliques à chaîne droite, a déjà été constatée [124]. Ces liaisons existent aussi entre les α carboxyles de l'acide polyglutamique obtenu par synthèse [73].

Etant donnée cette variabilité du point de fusion nous n'avons pu dans certains cas prendre cette constante physique comme critère de pureté.

FIGURE 4
Structure supposée des formes (A) et (B)

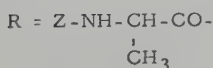
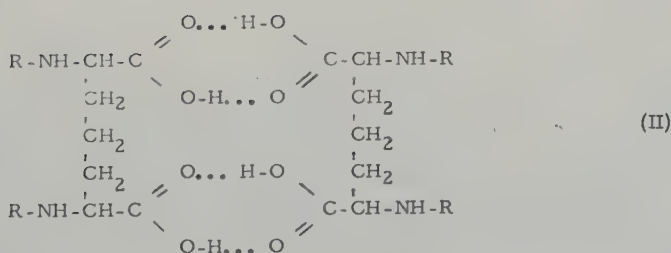
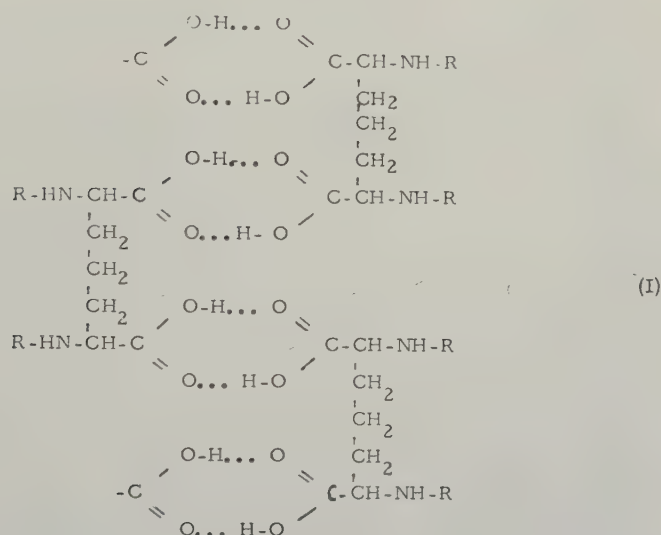


TABLEAU I

*Caractéristiques des dérivés symétriques du meso-DAP
dont la synthèse a été effectuée pour la première fois*

N°	DÉRIVÉS	POINT DE FUSION	[α] 15-20° D	C %		H %		N %	
				Calc.	Tr.	Calc.	Tr.	Calc.	Tr.
2	Diester méthylrique du <i>meso</i> -DAP, 2 HCl	197,5-198,5°		37,12	37,08	6,93	6,89	9,62	9,65 (a)
3	Diester benzylrique du <i>meso</i> -DAP, dibenzène sulfonate	164 -165,5°		57,71	57,71	5,58	5,59	4,08	4,31 (b)
5	Dihydrazide du N, N'-bis-Z- <i>meso</i> -DAP	193 -195°		56,77	56,59	6,21	6,41	17,27	17,56
6	Diester benzylrique du N, N'-bis-Z- <i>meso</i> -DAP-bis(D-Ala)	166,5-167,5°	+ 14,9 $\pm$ 1° (c)	66,14	66,31	6,19	6,29	7,17	7,28
7	Diester benzylrique du N, N'-bis-Z- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	166 -167,5°	— 14,3 $\pm$ 1° (c)	66,14	65,88	6,19	6,26	7,17	7,25
8	N, N'-bis-Z- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	188 -189,5°	— 4 $\pm$ 1° (c)	57,98	57,55	6,04	6,10	9,33	9,36
10	<i>meso</i> -DAP-bis(D-Ala)	> 300°	+ 47,7 $\pm$ 1° (d)	46,98	46,80	7,28	7,40	16,87	16,90
11	<i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	> 300°	— 48,2 $\pm$ 1° (d)	46,98	47,10	7,28	7,47	16,87	16,66
12	diester méthylrique de la N, N'-bis(Z-L-Ala)- <i>meso</i> -DAP	134 -136°	+ 7,5 $\pm$ 1° (c)	59,22	59,16	6,41	6,46	8,91	9,05
13	Diester méthylrique de la N, N'-bis(Z-D-Ala)- <i>meso</i> -DAP	135,5-137,5°	— 6,9 $\pm$ 1° (c)	59,22	59,49	6,41	6,57	8,91	9,06

14	N, N'-bis(Z-D-Ala)- <i>meso</i> -DAP	146,5-148°	— 11,3 ± 1° (c)	57,99	57,83	6,04	6,0	9,33	9,54
15	N, N'-bis(Z-L-Ala)- <i>meso</i> -DAP	147 -148,5°	+ 10,4 ± 1° (c)	57,99	57,78	6,04	6,02	9,33	9,40
16	N, N'-bis(L-Ala)- <i>meso</i> -DAP	> 300°	+ 12,8 ± 1,5° (d)	46,98	46,64	7,28	7,46	16,87	16,85
17	N, N'-bis(D-Ala)- <i>meso</i> -DAP	> 300°	— 12,4 ± 1,5° (d)	46,98	46,53	7,28	7,30	16,87	16,88
18	tétraester benzylque du N, N'-(α-Z-L-Glu)- <i>meso</i> -DAP	119 -123°	— 1 ± 1° (c)	68,01	67,98	5,98	6,04	5,20	5,43
19	N, N'-bis(α-L-Glu)- <i>meso</i> -DAP, 2,5 H ₂ O	> 300°	+ 39 ± 1,5° (d)	41,37	41,60	6,75	7,05	11,35	11,11
20	Dihydrate du N, N'-bis(Z-L-Ala)- <i>meso</i> -DAP	210 -214°	+ 1,2 ± 1° (c)	55,40	55,81	6,41	6,75	17,82	17,55
21	Diester méthylque de la N, N'-bis-Z- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	222 -224°	— 14,3 ± 1° (c)	59,23	59,39	6,41	6,46	8,91	8,90
23	Diester méthylque de la N, N'-bis(Z-L-Ala)- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	224,5-226,5°	— 8 ± 1° (c)	57,64	57,71	6,53	6,88	10,90	10,96
24	N, N'-bis(Z-L-Ala)- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	194 -197,5°	— 1 ± 1° (c)	56,59	56,21	6,24	6,33	11,31	11,30
25	N, N'-bis(L-Ala)- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala), 2 H ₂ O	> 300°	— 14,7 ± 1° (d)	44,69	44,64	7,50	7,62	16,46	16,0

(*) Numérotation correspondant à la description de la synthèse dans la partie expérimentale.

(a) Cl % Calc. : 24,35 Tr. : 24,09

(b) S % Calc. : 9,34 Tr. : 9,31

(c) c = 2, diméthylformamide

(d) d = 2, HCl O,1 N.

Pour **vérifier l'homogénéité de nos dérivés**, nous nous sommes appuyés sur les critères suivants :

1. L'analyse élémentaire de C, H et N a été faite pour tous nos dérivés après deux recristallisations ; les résultats obtenus correspondent aux chiffres théoriques.

2. Les pouvoirs rotatoires des peptides énantiomorphes doivent être de signes opposés et de même valeur absolue. Une impureté, possédant un pouvoir rotatoire différent de celui envisagé, peut difficilement se retrouver en quantité équivalente dans les deux énantiomorphes ; aussi la quasi identité des valeurs absolues des pouvoirs rotatoires est-elle une preuve de leur pureté.

3. Les peptides et dérivés peptidiques possédant un groupement aminé libre ont été soumis à la chromatographie sur papier dans plusieurs mélanges de solvants et la révélation à la ninhydrine n'a montré à chaque fois qu'une seule tache, ce qui exclut la possibilité d'impuretés ayant un groupement aminé libre. Comme nous l'avons vu précédemment, cette méthode nous a été précieuse pour mettre en évidence des dérivés secondaires et pour suivre l'efficacité des méthodes de purification.

On trouvera dans la partie expérimentale (chapitre III, C-2) un tableau de R_F dans plusieurs mélanges de solvants des peptides du *meso*-DAP que nous avons préparés pour la première fois.

Le tableau I contient les dérivés du *meso*-DAP préparés par nous pour la première fois ainsi que leurs caractéristiques physiques : pouvoirs rotatoires, points de fusion, analyses élémentaires.

CHAPITRE II

Étude de la Spécificité de diverses Peptidases vis-à-vis des liaisons peptidiques auxquelles participe le *meso* - DAP.

Les liaisons peptidiques auxquelles participe le *meso*-DAP dans les peptides symétriques dont nous venons de décrire la synthèse, varient tant par la situation les uns par rapport aux autres des acides aminés impliqués dans ces liaisons que par la configuration optique des carbones asymétriques situés en α de part et d'autre de ces liaisons. En effet, si nous considérons les peptides symétriques contenant un acide aminé (alanine ou acide glutamique) et le *meso*-DAP, nous voyons qu'ils peuvent présenter trois structures différentes selon :

- que les molécules de cet acide aminé sont liées aux fonctions carboxyles du *meso*-DAP,
- qu'elles sont liées aux fonctions amines du *meso*-DAP,
- ou encore qu'elles sont liées simultanément aux quatre fonctions du *meso*-DAP.

Dans chacune de ces structures, on distingue deux énantiomorphes suivant la configuration L ou D du carbone asymétrique de l'alanine ou de l'acide glutamique.

La configuration *meso* du DAP entraîne, de plus, dans chacun de ces peptides, l'existence de liaisons en α d'un carbone L et en α d'un carbone D *.

(*) Au cours de cette étude nous appelons, selon l'habitude, liaisons L-L, D-D, L-D et D-L les liaisons peptidiques situées respectivement entre deux carbones asymétriques L, deux carbones D, un carbone L et un carbone D ou un carbone D et un carbone L.

Les peptidases susceptibles d'agir sur certaines de ces liaisons doivent posséder une spécificité en accord avec la structure de ces peptides : chaîne latérale aliphatique, existence de γ -carboxyles. Par contre, si l'on veut par leur action hydrolytique obtenir des peptides non symétriques de configuration stéréochimique déterminée, elles doivent posséder une stéréospécificité très nette. La carboxypeptidase A du pancréas et la leucine-aminopeptidase (LAP) du rein de porc nous semblaient répondre à ces exigences.

Pour tenter d'hydrolyser certaines liaisons résistant à l'action des deux enzymes précédents, nous avons étudié aussi l'action d'une peptidase bactérienne, la pronase, possédant une large spécificité tant structurale que stérique.

Pour chaque enzyme, nous indiquerons d'abord les données générales sur sa spécificité vis-à-vis des acides aminés habituels, telles qu'elles se trouvent dans la littérature. Nous décrirons ensuite les résultats que nous avons obtenus sur l'hydrolyse par ces peptidases des différents peptides synthétiques symétriques contenant le *meso*-DAP. Dans une brève discussion des résultats, nous montrerons les contributions apportées par cette étude au problème de structure des mucopeptides et les possibilités ainsi acquises de préparer des peptides non symétriques du *meso*-DAP de structure et de configuration déterminées.

A - CARBOXYPEPTIDASE A DU PANCRÉAS

Les carboxypeptidases sont des enzymes protéolytiques qui hydrolysent la liaison peptidique adjacente au carboxyle libre de l'extrémité C-terminale des peptides et des protéines. La procarboxypeptidase A, sécrétée par le pancréas sous forme de zymogène, est transformée en carboxypeptidase par action de la trypsine *. La carboxypeptidase A a été isolée sous forme cristalline en 1937 par ANSON [75]** : c'est une métalloprotéine qui cristallise en présence de zinc ; celui-ci est nécessaire à son activité.

Cet enzyme existe dans le commerce à l'état pur, trois fois recristallisé ; il peut cependant posséder une légère action chymotrypsique qui, agissant au niveau des acides aminés aromatiques, ne peut pas nuire à nos études.

(*) Le pancréas libère de la même façon une autre procarboxypeptidase, appelée B, donnant naissance à une carboxypeptidase B de spécificité différente.

(**) Récemment NEURATH et coll. ont décrit deux autres méthodes de préparation [76, 77].

1 - SPÉCIFICITÉ

La spécificité de la carboxypeptidase A étudiée par NEURATH [78] et par SMITH [79] sur des peptides synthétiques peut être résumée de la façon suivante :

a) **L'acide aminé C-terminal** — c'est-à-dire dont la fonction amine est impliquée dans la liaison peptidique hydrolysée — doit présenter les caractères suivants :

- son carboxyle doit être libre,
- il doit être de configuration L et avoir de préférence une chaîne aromatique ou bien aliphatique longue,
- sa fonction amine doit être située en α de la fonction carboxyle * ; l'encombrement causé par la substitution de l'hydrogène de cette fonction amine empêche l'hydrolyse (cas de la proline),
- il ne doit pas posséder de groupement basique libre dans sa chaîne latérale.

b) La spécificité de la carboxypeptidase vis-à-vis de l'**acide aminé pénultième** (c'est-à-dire celui dont le carboxyle est impliqué dans la liaison peptidique hydrolysée) dépend de la présence ou de l'absence d'une « liaison peptidique secondaire » ; on appelle ainsi la liaison peptidique dans laquelle est impliquée l'amine de l'acide aminé pénultième. Cet aspect de la spécificité a été étudié principalement par YANARI et MITZ [80] et accessoirement par FU et coll. [81]. Dans le cas où cette liaison peptidique secondaire existe et où l'acide aminé pénultième est de configuration L, la nature de sa chaîne latérale a peu d'importance **. S'il est de configuration D, l'hydrolyse est en général impossible ; on peut noter cependant une très légère action de l'enzyme lorsque sa chaîne latérale est courte (D-alanyl-L-tyrosine).

Par contre, en l'absence de cette liaison peptidique secondaire, l'action de la carboxypeptidase est très fortement diminuée ***. Elle perd en outre presque totalement sa stéréospécificité vis-à-vis du carbone asymétrique de l'acide aminé pénultième et la nature de la chaîne latérale de celui-ci devient importante : la carboxypeptidase a alors une préférence pour les acides aminés aromatiques ou à chaîne latérale longue.

(*) Cette fonction amine peut être remplacée par une fonction hydroxy comme dans le cas du β -phényllactate de la benzoyl-glycine [78].

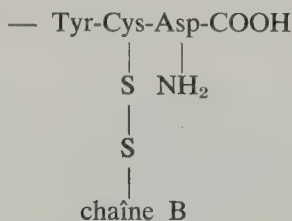
(**) On peut noter cependant une activation de l'hydrolyse lorsque cet acide aminé est le tryptophane et un ralentissement dans le cas de l'acide glutamique.

(***) Dans cette liaison le -NH- de l'amine est important (faible hydrolyse dans le cas de la liaison -CO-N<) ainsi que le carbonyle (faible hydrolyse des p-toluènesulfonyl-peptides : liaison -SO₂-NH-).

L'existence de cette liaison peptidique secondaire joue donc un rôle important dans la stéréospécificité de la carboxypeptidase vis-à-vis de la configuration optique de l'acide aminé pénultième.

Les travaux concernant l'action de la carboxypeptidase sur les chaînes peptidiques plus longues et sur les protéines permettent de conclure que, si le carboxyle terminal est libre (c'est-à-dire n'est ni amidé, ni impliqué dans un cycle) et s'il n'y a pas d'empêchement par la structure tertiaire de la protéine (comme dans le cas des protéines natives) [82], la carboxypeptidase peut détacher successivement presque tous les acides aminés existant habituellement dans les protéines (à l'exception de la proline, de la lysine, de l'arginine et, semble-t-il, de la cystine).

Comme le DAP, la **cystine** est un acide diaminé dicarboxylique ; aussi, nous considérerons avec plus de détails les données que l'on trouve dans la littérature sur la libération par la carboxypeptidase de cet acide aminé. Il ne semble pas jusqu'à présent y avoir de travaux faits sur des peptides modèles possédant la cystine en position C-terminale. Cependant, LI et CUMMINS [83, 84] rapportent que la prolactine qui possède une cystine C-terminale, résiste à l'action de la carboxypeptidase. Des travaux récents de SLOBIN et CARPENTER [85], concernant l'action de la carboxypeptidase sur la chaîne A de l'insuline, qui se termine par l'enchaînement



montrent qu'après libération d'asparagine, la liaison-Tyr-Cys-COOH n'est pas hydrolysée.



2 - RÉSULTATS OBTENUS

Les dérivés peptidiques et les peptides du *meso*-DAP qui ont été soumis à l'action de la carboxypeptidase A et les conditions utilisées pour leur incubation sont résumées dans le tableau II ; la structure du peptide (II) se trouve dans la figure 3, chapitre I et celle des dérivés (VI), (VII) et (VIII) dans la figure 5.

TABLEAU II

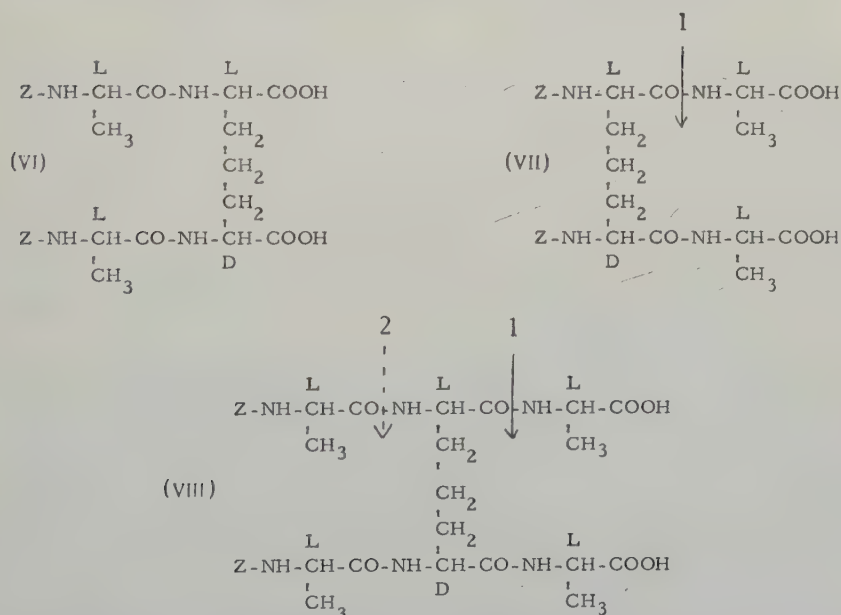
Conditions utilisées pour l'action de la carboxypeptidase A sur les dérivés peptidiques et peptides du meso-DAP

DÉRIVÉS PEPTIDIQUES ET PEPTIDES SOU MIS A L'ACTION DE LA CARBOXYPEPTIDASE A	CONCENTRATION DU SUBSTRAT (en M/l)	CONCENTRATION DE L'ENZYME (en µg d'N protéique/ml)*			
(II) <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	$1 \cdot 10^{-2}$	1	12,5	25	50
(VI) N, N'-bis(Z-L-Ala)- <i>meso</i> -DAP	$1 \cdot 10^{-2}$	1	12,5	25	50
(VII) N, N'-bis-Z- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	$1,6 \cdot 10^{-3}$		1,32		
(VIII) N, N'-bis(Z-L-Ala)- <i>meso</i> -DAP-bis (L-Ala)	$4 \cdot 10^{-3}$		5		

(*) La concentration des solutions d'enzyme est mesurée par détermination de leur absorption à 278 mµ au spectrophotomètre Beckman ; le coefficient d'extinction de la carboxypeptidase dans ces conditions est de $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/l ml}} = 1,93$ [86] et le pourcentage de N de la protéine 15,1 %.

FIGURE 5

Action de la carboxypeptidase et de la leucine-aminopeptidase sur les dérivés peptidiques du meso-DAP



Dérivé (VI) : aucune liaison n'est hydrolysée.

Dérivé (VII) : hydrolyse en 1.

Dérivé (VIII) : hydrolyse en 1. Le produit obtenu après action de la carboxypeptidase et hydrogénation catalytique des groupements Z, est hydrolysé en 2 par la leucine-aminopeptidase.

Dans tous les cas, le substrat est dissous dans du tampon véronal 0,02 M de pH 7,5 (pH optimum de la carboxypeptidase vis-à-vis des substrats ne possédant pas de fonction acide supplémentaire ni de noyau imidazole) ; la molarité en NaCl est de 0,25 M et la température de 37°.

L'hydrolyse enzymatique a été suivie par chromatographie sur papier de l'hydrolysats dans le mélange de solvants A * et révélation à la ninhydrine ; on met ainsi en évidence la fonction amine apparue par hydrolyse d'une liaison peptidique. Dans les cas où nous avons pu détecter une hydrolyse, l'alanine libérée a été dosée par la ninhydrine selon la méthode de MOORE et STEIN [87] comparativement à une gamme étalon de ce même acide aminé. Le dérivé peptidique non symétrique du *meso*-DAP formé par cette hydrolyse enzymatique a été caractérisé de plusieurs façons : d'abord par chromatographie sur papier dans plusieurs mélanges de solvants du peptide obtenu par hydrogénation de ce dérivé, puis par détermination du rapport moléculaire du DAP et de l'alanine après hydrolyse acide totale de ce peptide, suivant la méthode mise au point au laboratoire (voir partie expérimentale, chapitre III, B, 3).

a) *Hydrolyse des liaisons peptidiques impliquant les fonctions carboxyles du meso-DAP.*

Cette étude a d'abord été faite sur le substrat N, N'-bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala) (VII). La libération d'alanine en fonction du temps est exprimée par la courbe de la figure 6. On constate qu'après 4 heures, l'action enzymatique est terminée, car l'addition d'une nouvelle quantité d'enzyme ne provoque plus de libération d'alanine, même après une incubation prolongée. D'après les dosages effectués, la concentration de l'alanine libérée est de 1,55 mM ; or la concentration du substrat au début de l'expérience était de 1,6 mM. Il y a donc à la fin de la réaction enzymatique libération d'un seul équivalent d'alanine, le deuxième restant lié au N, N'-bis-Z-*meso*-DAP.

L'examen, par chromatographie sur papier, du produit obtenu après hydrogénolyse du dérivé peptidique carbobenzoxylé résultant de l'action de la carboxypeptidase, montre la présence d'une seule tache qui se situe entre les taches correspondant au *meso*-DAP et au *meso*-DAP-bis(L-Ala) témoins. Le dosage de la quantité de DAP et d'alanine, existant après hydrolyse acide totale de ce dérivé peptidique carbobenzoxylé, a montré que le rapport moléculaire de ces deux acides aminés est égal à l'unité.

Ces résultats permettent de conclure que l'alanine libérée provient de l'hydrolyse d'une seule liaison peptidique. Etant donnée la spécificité de cette carboxypeptidase en ce qui concerne la configuration optique du

(*) Toutes les données sur la chromatographie sur papier sont exposées dans la partie expérimentale, chapitre III C.

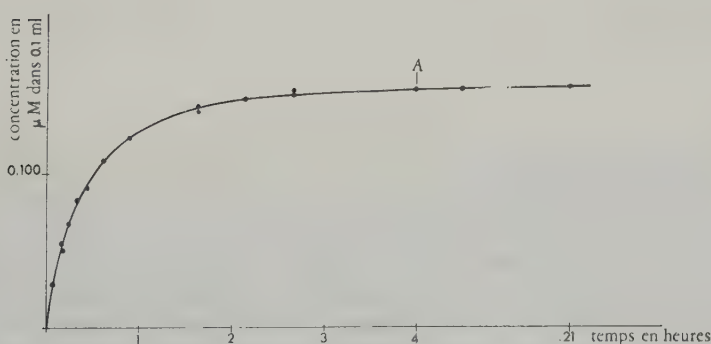
résidu pénultième des peptides N-acylés, on peut conclure que l'action de cet enzyme s'est limitée à l'hydrolyse de la liaison L-L et que le dérivé peptidique résultant de cette action à la structure N, N'-bis-Z-*meso*-DAP(D)-L-Ala.

L'isolement, à l'échelle préparative, de ce dérivé ainsi que du peptide libre correspondant *meso*-DAP(D)-L-Ala a permis d'effectuer leur analyse élémentaire : les pourcentages de C, H et N obtenus sont en accord avec les pourcentages théoriques (voir partie expérimentale, chapitre II, dérivés 1° et 2°). En outre, par action de la leucine aminopeptidase (ce chapitre, paragraphe B-2, a) sur le *meso*-DAP-bis(L-Ala), on obtient un dipeptide ayant les mêmes caractéristiques que celui obtenu dans cette expérience.

Des essais effectués avec le *meso*-DAP-bis(L-Ala) (II) ont montré que, en l'absence de groupement N-acylés, même une forte concentration en carboxypeptidase ne libère pas d'alanine.

FIGURE 6

*Libération d'alanine en fonction du temps d'action
de la carboxypeptidase A sur le bis-Z-meso-DAP-bis(L-Ala) ;
en A nouvelle addition de carboxypeptidase*



b) *Hydrolyse des liaisons peptidiques impliquant les fonctions amines du meso-DAP.*

Les essais effectués avec le dérivé peptidique N, N'-bis(Z-L-Ala)-*meso*-DAP (VI) ont montré que la carboxypeptidase A n'hydrolyse pas ce peptide N-acylé : aucune fonction amine n'est libérée même en présence de fortes concentrations d'enzyme. Cette résistance concerne donc non seulement la liaison L-D mais aussi la liaison L-L de ce peptide.

c) *Hydrolyse des liaisons peptidiques impliquant les fonctions carboxyles et amines du meso-DAP.*

L'action de la carboxypeptidase A sur le N, N'-bis(Z-L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) (VIII) libère de l'alanine. Lorsque la réaction est terminée (c'est-à-dire lorsque la concentration de l'alanine est constante) nous hydrogénons le dérivé peptidique carbobenzoxyté résultant de l'action de la carboxypeptidase. Le peptide ainsi obtenu est pur par chromatographie sur papier et se situe entre le bis(L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) et le L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala [obtenu par l'action de la LAP sur le bis(L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) (voir ce chapitre B, 2, c)]. En outre, dans ce peptide, après hydrolyse acide totale, nous avons dosé le DAP et l'alanine : il y a trois molécules d'alanine pour une molécule de DAP.

La carboxypeptidase a donc libéré une seule molécule d'alanine. D'après les résultats précédents, la seule molécule susceptible d'être libérée est l'alanine liée au carboxyle du *meso*-DAP en α du carbone L.

Le peptide, obtenu après action de la carboxypeptidase et après hydrogénolyse, est soumis à l'action de la leucine aminopeptidase du rein de porc ; de l'alanine est alors libérée. A la fin de l'hydrolyse, on obtient un peptide ayant les mêmes valeurs de R_F et la même coloration que le peptide L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala, obtenu par action directe de la LAP sur le bis(L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) (voir ce chapitre B, 2°, c). Ceci nous permet de donner une nouvelle preuve de la structure de ce peptide L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala.

3 - DISCUSSION

Parmi les différentes liaisons qui existent entre la L-alanine et les quatre groupements polaires du *meso*-DAP, **une seule** peut être hydrolysée : c'est la liaison entre l'alanine et le carboxyle en α du carbone L du *meso*-DAP. Cette hydrolyse n'est possible que si les fonctions amines du *meso*-DAP sont acylées. Dans ce cas, la stéréospécificité de la carboxypeptidase est absolue : il n'y a aucune hydrolyse de la liaison D-L car l'acide aminé pénultième (*meso*-DAP) a une chaîne latérale encombrante. Par contre, si les deux fonctions amines sont libres, il n'y a aucune hydrolyse ; car, comme nous l'avons vu au paragraphe 1, sans liaison peptidique secondaire, l'action de la carboxypeptidase est très ralentie et n'est décelable qu'avec les meilleurs substrats, c'est-à-dire ceux qui possèdent un acide aminé terminal aromatique. Nous ne savons cependant pas si l'hydrolyse serait possible dans le cas où seule la fonction amine en α du carbone L serait acylée.

Lorsque le DAP est en position C-terminale et que ses deux fonctions

amines sont impliquées dans des liaisons peptidiques avec la L-alanine, il n'y a aucune hydrolyse. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le cas des liaisons peptidiques avec la L-cystine décrits dans le paragraphe 1. Mais, comme pour cet acide aminé, on ne peut savoir si cette résistance à l'action de la carboxypeptidase provient de l'existence d'un encombrement stérique dû aux liaisons peptidiques en ϵ , ou bien provient de la structure même de ces acides aminés. Il serait intéressant d'étudier l'hydrolyse d'un peptide non symétrique du *meso*-DAP où seule la fonction amine en α du carbone L serait impliquée dans une liaison peptidique. La présence d'une fonction ϵ -NH₂ qui inhibe l'action de la carboxypeptidase dans le cas de la lysine, sera peut-être compensée par la présence de l' ϵ -carboxyle.

De ces conclusions nous pouvons déduire quelques données en ce qui concerne l'interprétation des résultats obtenus lorsque l'on utilise la carboxypeptidase A pour déterminer les résidus C-terminaux des mucopeptides [28, 44, 88, 89].

La possibilité de libérer un acide aminé de configuration L, lié au *meso*-DAP, par l'action de la carboxypeptidase nécessite les conditions suivantes :

- cet acide aminé doit être lié au carboxyle situé en α du carbone L du *meso*-DAP ;
- la fonction amine située en α du carbone L doit être acylée, le groupement acyle pouvant être le carboxyle d'une chaîne peptidique ;
- il est probable que l'acylation de la deuxième fonction amine soit aussi nécessaire.

Lorsque le *meso*-DAP est en position C-terminale, aucune de ses fonctions amines ne peut être libérée, lorsque celles-ci sont toutes les deux impliquées dans des liaisons peptidiques ; cependant il n'est pas exclu que le *meso*-DAP soit détaché si seule la fonction amine en α du carbone L est impliquée dans une liaison peptidique.

Pour pouvoir connaître dans tous ses détails le comportement de la carboxypeptidase A vis-à-vis des peptides naturels du *meso*-DAP, il serait donc nécessaire de préparer quelques peptides non symétriques possédant des enchaînements peptidiques en α de part et d'autre du carbone L du *meso*-DAP. D'après une hypothèse de WORK, la structure des mucopeptides contenant le *meso*-DAP serait d'ailleurs représentée par un tel enchaînement [9].

D'après nos propres résultats, nous pouvons cependant déjà conclure que l'absence d'action de cette carboxypeptidase sur des chaînes pepti-

diques, qui comportent des acides aminés L et D accrochés au *meso*-DAP, n'implique pas obligatoirement l'absence d'acide aminé L en position C-terminale : un résidu de L-alanine ou de *meso*-DAP peut se trouver dans cette position avec des carboxyles libres sans que l'action de la carboxypeptidase A puisse révéler leur présence.

Dans la suite de notre travail, cette étude nous a permis de mettre au point une méthode de préparation de peptides non symétriques relativement simple puisque une extraction entre une phase aqueuse acide et une phase organique permet de séparer les dérivés résultant de l'hydrolyse enzymatique, c'est-à-dire l'alanine et le peptide acylé non symétrique du *meso*-DAP. Nous avons pu ainsi préparer le N, N'-bis-Z-*meso*-DAP(D)-L-Ala, le N, N'-bis(Z-L-Ala)-*meso*-DAP(D)-L-Ala et les peptides libres correspondants. Leur isolement est décrit dans la partie expérimentale, chapitre II, n^{os} 1, 2, 3, 4.

B - LEUCINE AMINOPEPTIDASE DU REIN DE PORC

Les aminopeptidases sont des enzymes largement répandus dans tous les organismes. Comme leur nom l'indique, ce sont des exopeptidases qui hydrolysent la liaison peptidique des peptides et des protéines, adjacente à la fonction amine de leur extrémité N-terminale. Certains de ces enzymes, qui possèdent une plus grande affinité pour les peptides ayant le groupement aminé libre de la leucine, sont appelés leucine aminopeptidases (LAP). Les plus connues sont celle isolée à partir du rein de porc * [90, 91] et celle du cristallin de l'œil de bœuf [96, 97]. Si la purification de la LAP du rein de porc n'a pas été jusqu'à cristallisation **, sa pureté est cependant tout à fait suffisante pour nos études ; elle possède l'avantage d'avoir une spécificité largement étudiée et aussi de pouvoir être obtenue dans le commerce ***. C'est une protéine qui a besoin, pour sa stabilité et son activité, des ions Mn^{++} ou Mg^{++} .

1 - SPÉCIFICITÉ

La spécificité de cette LAP vis-à-vis de différents substrats synthétiques a été étudiée en détail par SMITH et coll. [99, 100]. L'enzyme

(*) Il s'agit ici de la LAP préparée par SMITH et coll. et non pas de celle décrite par BINKLEY [92, 93] et étudiée ces derniers temps par MATHESON et coll. [94, 95] qui reste liée aux particules dans l'homogénat du rein de porc et qui est de nature nucléoprotéique.

(**) La LAP du cristallin de l'œil de bœuf vient d'être récemment cristallisée [98].

(***) *Worthington Biochemical corporation* (Freehold, New-Jersey).

utilisé dans nos études est un enzyme partiellement purifié provenant du rein de porc ; mais SMITH et coll. ont montré que la spécificité d'un enzyme partiellement purifié [101, 102] (isolé à partir de la muqueuse intestinale) est la même que celle de l'enzyme hautement purifié à partir du rein de porc.

L'action de la LAP dépend de la structure et de la configuration optique de l'acide aminé N-terminal et de celles de l'acide aminé pénultième.

Pour pouvoir étudier les exigences de la LAP, vis-à-vis de l'**acide aminé N-terminal**, indépendamment de l'acide aminé pénultième, SMITH et coll. ont comparé la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amide primaire ($-CO-NH_2$) de différents acides aminés. Il ressort de leurs études :

- que la fonction amine de cet acide aminé doit être libre et en α du carboxyle,
- que son carbone asymétrique doit être de configuration L,
- qu'il doit avoir, de préférence, une chaîne latérale aliphatique, ne possédant pas de groupement polaire ; la vitesse d'hydrolyse augmente avec la longueur de la chaîne mais des ramifications sur le β -carbone la ralentissent.

Les études faites sur la structure et la configuration nécessaires à l'**acide aminé pénultième** montrent :

- que la fonction amine peut être en β du carboxyle mais qu'elle doit posséder un hydrogène libre (inhibition au niveau de la proline) ;
- que le carbone asymétrique peut être de configuration D. L'hydrolyse dans ce cas est lente et d'autant plus ralentie que la chaîne latérale de cet acide aminé D est longue ; si son carbone β est encombré, il n'a aucune hydrolyse ;
- la LAP montre la même préférence pour la structure de la chaîne latérale de l'acide aminé pénultième que pour celle de l'acide aminé terminal.

La stéréospécificité de la LAP, vis-à-vis de l'acide aminé N-terminal, est donc très stricte : aucune liaison peptidique entre le carboxyle d'un acide aminé D et l'amine d'un acide aminé L ou D (liaison D-L ou D-D) ne peut être hydrolysée. Par contre, dans certains cas, les liaisons L-D peuvent être rompues. C'est pourquoi la LAP est employée pour déterminer la non racémisation des peptides synthétiques ; son action s'arrête au niveau des acides aminés D.

Les protéines ont été aussi soumises à l'action de la LAP. Tous les acides aminés sont détachés (puisque'ils sont des α -aminoacides de confi-

TABEAU III

Conditions utilisés pour l'action de la LAP sur les peptides du meso-DAP

PEPTIDES SOUMIS A L'ACTION DE LA LAP	CONCENTRATION DU SUBSTRAT (en M/l)	CONCENTRATION EN ENZYME (en µg de protéine/ml)	ACTIVITÉ DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES* (minutes)	pH**	TEMPS POUR L'HYDROLYSE TOTALE (en heures)
(I) bis(L-Ala)-meso-DAP	0,027	20	40	8,85	4
(II) meso-DAP-bis(L-Ala)	0,027	20	40	8,85	4,5
meso-DAP-bis(D-Ala)	0,025	60	40	8,85	
(III) bis(L-Ala)-meso-DAP-bis(L-Ala)	0,012	200	55	8,3	30
(IV) bis(L-Glu)-meso-DAP	0,029	200	30	8,3	4,5
(V) meso-DAP-bis(α-L-Glu-D-Ala)	0,014	150	80	8,3	22

(*) L'activité des solutions enzymatiques utilisées étant variable suivant les lots, elle a été définie approximativement en déterminant par chromatographie sur papier le temps nécessaire pour hydrolyser la moitié de l'amide de la L-leucine présente, dans des conditions déterminées et identiques dans chaque cas (voir partie expérimentale, chapitre II).

(**) Le pH optimum de la LAP est de 8,9 à 9,1. Mais si l'incubation doit être longue, il est préférable de choisir un pH moins élevé pour éviter une inactivation de l'enzyme assez rapide à pH 9.

guration L) [103, 104]. Cependant, au niveau des résidus de proline, l'hydrolyse est arrêtée [105].

Nous insisterons sur l'hydrolyse par la LAP des protéines au niveau des résidus de **L-cystine** puisque les problèmes concernant cet acide aminé se rapprochent de ceux que nous allons envisager. Au niveau de ces résidus il y a un net ralentissement de l'hydrolyse, mis en évidence par SMITH et coll. [106] lors de l'étude de l'action de la LAP sur l'insuline et par HILL et coll. [105] d'autre part lors de l'hydrolyse de nombreuses protéines. Cependant, dans l'ocytocine, qui possède une cystine N-terminale dont trois des groupements polaires sont impliqués dans des liaisons peptidiques, il est possible de détacher par l'action de la LAP la cystine et tous les acides aminés [104].

2 - RÉSULTATS OBTENUS

Grâce à des essais préliminaires, nous avons pu déterminer les conditions optima d'action pour chacun des peptides symétriques du *meso*-DAP étudiés. La formule de ces peptides se trouve dans la figure 3 (partie générale, chapitre I). Les résultats sont résumés dans le tableau III.

Dans tous les cas, la concentration en Mg^{++} est de 0,005 M * et le tampon utilisé est le tris-hydroxyméthylaminométhane-HCl de molarité 0,2 M.

L'hydrolyse enzymatique a été suivie par l'étude de fractions aliquotes de l'hydrolysate à des temps variés, soit par chromatographie sur papier dans plusieurs mélanges de solvants et révélation à la ninhydrine ** soit par dosage colorimétrique à la ninhydrine. Dans le chapitre III, paragraphe A de la partie expérimentale, nous décrirons les dosages à la ninhydrine pH 5 selon MOORE et STEIN et à la ninhydrine pH ≤ 1 selon GILVARG [107] ; dans le paragraphe B sont données les applications de ces deux méthodes à l'étude de l'hydrolyse des peptides du *meso*-DAP par la LAP. Des courbes représentant l'évolution de l'hydrolyse par la LAP en fonction du temps de différents substrats ont ainsi pu être tracées.

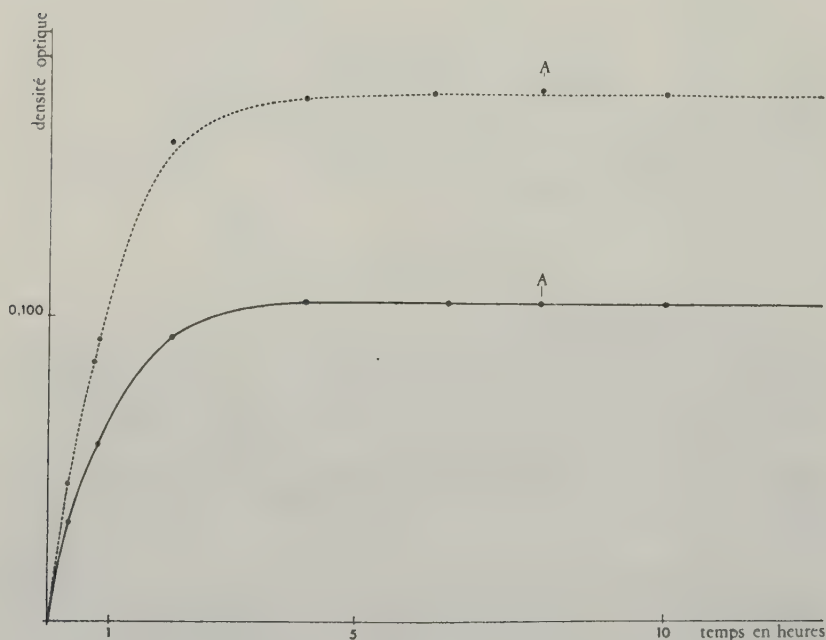
La caractérisation des produits de l'hydrolyse a été faite après leur séparation sur une colonne d'Amberlite CG-120 et dessalification des

(*) Nous avons préféré le Mg^{++} au Mn^{++} car avec le temps celui-ci précipite en présence de l'oxygène de l'air sous forme de MnO_2 qui adsorbe la protéine ; les solutions d'enzyme ne sont alors plus homogènes.

(**) Les possibilités d'utilisation de deux mélanges de solvants, pour étudier la composition de l'hydrolysate de différents peptides, sont décrites dans la partie expérimentale, chapitre III, C 2.

FIGURE 7

Hydrolyse par le LAP du peptide (II) meso-DAP-bis(L-Ala)

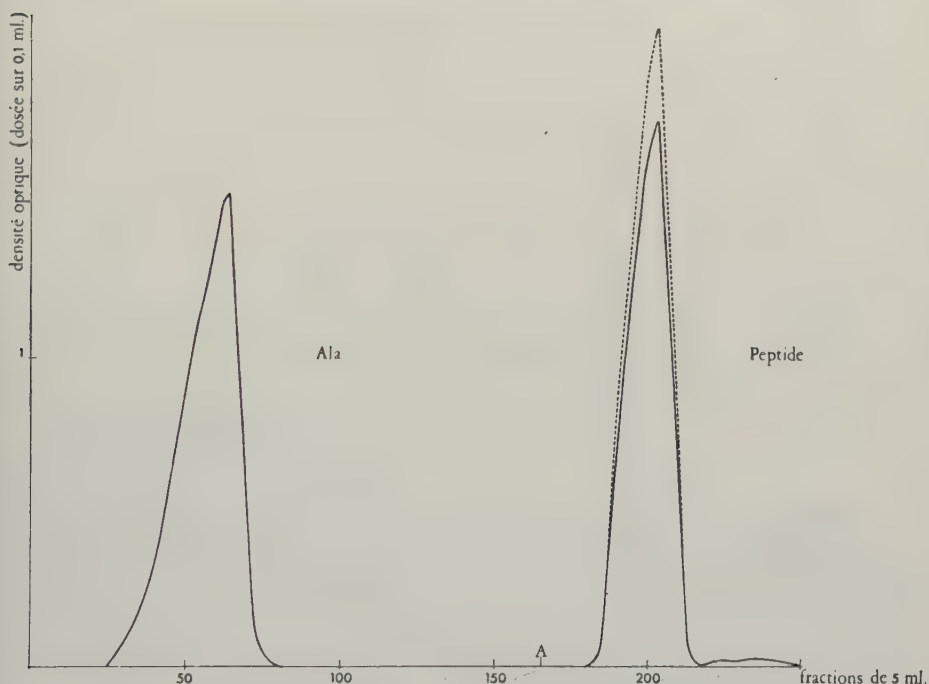


L'augmentation de la densité optique, obtenue à partir d'une fraction aliquote de l'hydrolysate traitée par la ninhydrine pH 5 (courbe en trait plein) ou par la ninhydrine pH ≤ 1 (courbe en pointillé), est représentée en fonction du temps d'incubation; en A, B ou C, addition d'une nouvelle quantité d'enzyme. (Voir partie expérimentale.)

produits ainsi obtenus sur une colonne de Dowex 2. La nature des différents composants ainsi séparés est déjà indiquée par leur position dans la courbe d'élution — les acides aminés sont élués par un tampon de pH 3,25 et les peptides du DAP par un tampon de pH 4,25 (voir partie expérimentale, chapitre II, 5) — ainsi que par leur valeur de R_F pendant leur chromatographie sur papier. Leur composition a été déterminée soit par chromatographie sur papier, soit par dosage des acides aminés obtenus après leur hydrolyse acide totale (partie expérimentale, chapitre III, B 3). Dans certains cas, les peptides ont été isolés en quantité suffisante pour permettre leur analyse élémentaire.

FIGURE 8

*Séparation sur colonne d'Amberlite CG 120
selon la méthode de Moore et coll. [111] des produits obtenus
par action de la LAP sur le peptide (II) meso-DAP-bis(L-Ala)*



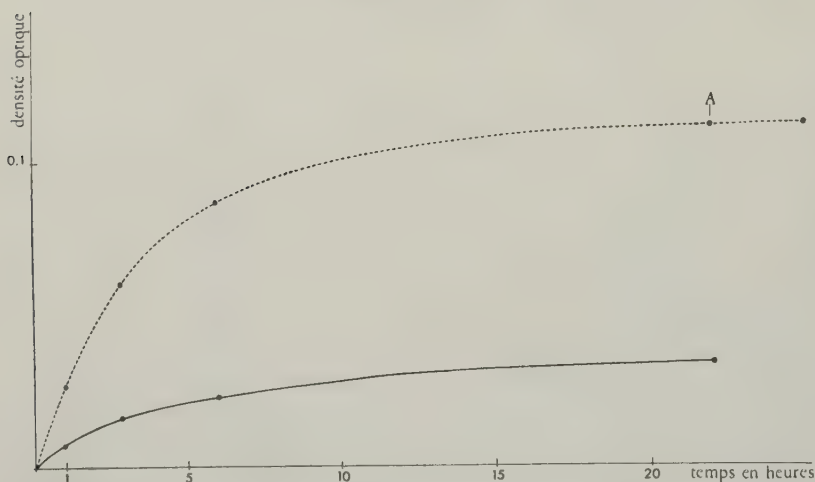
Le tampon citrate 0,2 M, pH 3,25 est passé sur la colonne jusqu'au point A ; l'élution est ensuite faite par le tampon 0,2 M, pH 4,25. En abscisse, est porté le numéro d'ordre des fractions récoltées à la sortie de la colonne ; le volume de ces fractions est indiqué dans chaque cas. En ordonnée, est portée la densité optique obtenue par dosage à la ninhydrine pH 5 (courbe en trait plein) ou pH ≤ 1 (courbe en pointillé) d'une partie aliquote de ces fractions, dont le volume est indiqué dans chaque cas.

a) *Hydrolyse des liaisons impliquant les fonctions carboxyles du meso-DAP :*

Nous avons étudié l'action de la LAP sur le peptide (II) *meso*-DAP-bis(L-Ala). Les courbes représentant l'hydrolyse de ce substrat en fonction du temps (figure 7) montrent que celle-ci est totale au bout de 4 heures 30 car l'incubation après une nouvelle addition d'enzyme ne provoque plus d'augmentation de la coloration. L'analyse de cet hydrolysat par chromatographie sur papier et sur colonne (figure 8) montre

FIGURE 9

Hydrolyse par la LAP du peptide (V) *meso*-DAP-bis(α -L-Glu-D-Ala)
(Voir légende figure 7)



uniquement la présence d'alanine et d'un peptide ayant toutes les caractéristiques du *meso*-DAP(D)-L-Ala, déjà obtenu par l'action de la carboxypeptidase sur le peptide (II) carbobenzoxyté (R_F - réaction colorimétrique - pouvoir rotatoire - analyse élémentaire).

A la fin de la réaction, le dosage à la ninhydrine de l'hydrolysate nous a permis de déterminer la quantité du *meso*-DAP(D)-L-Ala présent — grâce à une gamme étalon faite avec ce peptide obtenu précédemment — : soit 0,094 μ moles de ce peptide pour une quantité d'alanine de 0,102 μ moles. Il y a donc une molécule d'alanine libérée pour une molécule de *meso*-DAP(D)-L-Ala formée.

Ces résultats permettent de conclure que la LAP hydrolyse rapidement la liaison L-L du peptide (II) ; vue la stéréospécificité de la LAP exposée précédemment, la liaison D-L n'est évidemment pas hydrolysée.

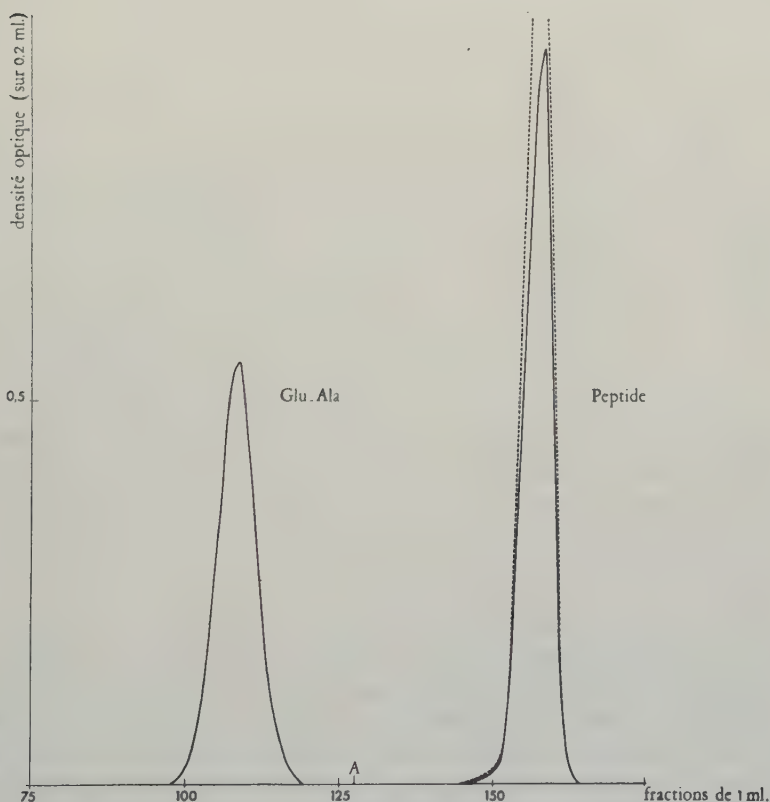
L'incubation du *meso*-DAP-bis(D-Ala) énantiomorphe du précédent a montré une faible libération d'alanine au bout de 20 heures. Il s'agit ici d'une faible hydrolyse de la liaison L-D car, suivant sa stéréospécificité, la LAP ne peut hydrolyser la liaison D-D.

L'hydrolyse du pentapeptide (V) *meso*-DAP-bis(α -L-Glu-D-Ala) suivie par dosages à la ninhydrine acide, est exprimée par la courbe de la figure 9 ; la réaction est terminée au bout de 20 heures : l'addition d'une

FIGURE 10

*Séparation sur colonne d'Amberlite CG 120
des produits obtenus par action de la LAP sur le peptide (V)
meso-DAP-bis(α -L-Glu-D-Ala)*

(Voir légende figure 8)



nouvelle quantité d'enzyme n'apporte aucun changement de coloration.

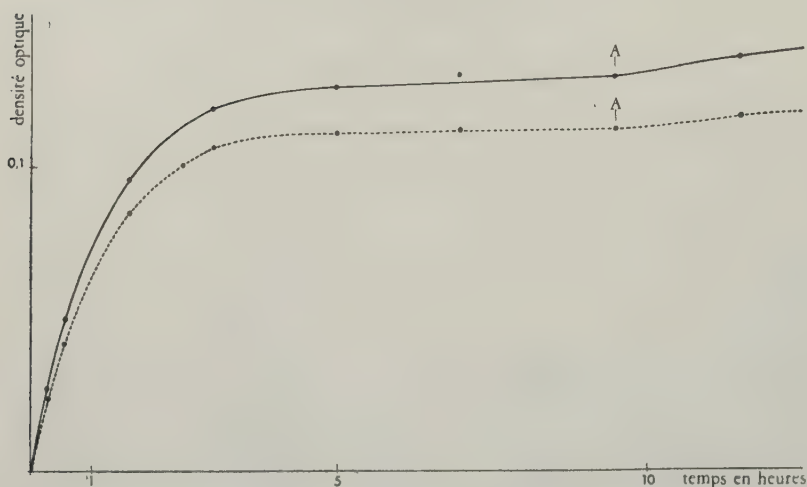
L'examen de cet hydrolysât par chromatographie sur papier et sur colonne (figure 10) montre la présence de deux peptides uniquement : le premier contient de l'alanine et de l'acide glutamique *, le second contient du *meso*-DAP, de l'alanine et de l'acide glutamique en quantités équivalentes.

(*) Il faut noter que si l'on prolonge l'hydrolyse enzymatique, la concentration de ce peptide diminue et il apparaît de l'alanine et de l'acide glutamique par hydrolyse de la liaison L-Glu-D-Ala.

FIGURE 11

Hydrolyse par la LAP du peptide (I) bis(L-Ala)-meso-DAP

(Voir légende figure 7)



La liaison entre le carboxyle en α du carbone L du *meso*-DAP et la fonction amine du peptide α -L-Glu-D-Ala a donc été entièrement hydrolysée, donnant naissance au peptide *meso*-DAP(D)-(α -L-Glu-D-Ala) et α -L-Glu-D-Ala. Cependant, cette hydrolyse a été beaucoup plus lente que celle du peptide (II) quoique le rapport activité enzymatique/concentration en substrat soit beaucoup plus grand.

b) *Hydrolyse des liaisons impliquant les fonctions amines du meso-DAP :*

Nous avons d'abord étudié l'action de la LAP sur le peptide (I) bis(L-Ala)-*meso*-DAP. D'après les courbes de la figure 11, on voit que l'hydrolyse enzymatique est à peu près terminée au bout de 4 heures 30 ; cependant une légère hydrolyse est encore décelable et une nouvelle addition d'enzyme augmente légèrement la vitesse de celle-ci. La chromatographie sur papier et sur colonne (figure 12) montre qu'il existe dans l'hydrolysât non seulement de l'alanine et un peptide dont l'analyse élémentaire en C, H et N correspond à celle d'un dérivé mono-alanyl-*meso*-DAP, mais aussi du *meso*-DAP libre.

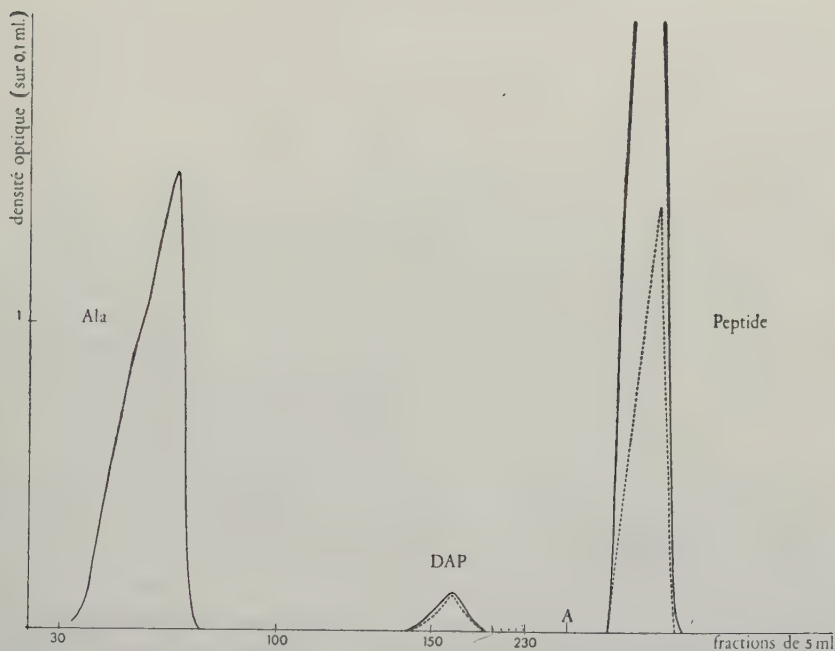
On peut donc conclure que la LAP hydrolyse entièrement la liaison L-L du peptide (I) en libérant le peptide L-Ala-(D)*meso*-DAP, mais que, dans ce peptide, la liaison L-D est très lentement hydrolysée donnant naissance à du *meso*-DAP*.

(*) Il faut noter que si l'enzyme est incubé en présence de cobalt, la libération de *meso*-DAP est beaucoup plus forte.

FIGURE 12

*Séparation sur colonne d'Amberlite CG 120
des produits obtenus par action de la LAP sur le peptide (I)
bis(L-Ala)-meso-DAP*

(Voir légende figure 8)



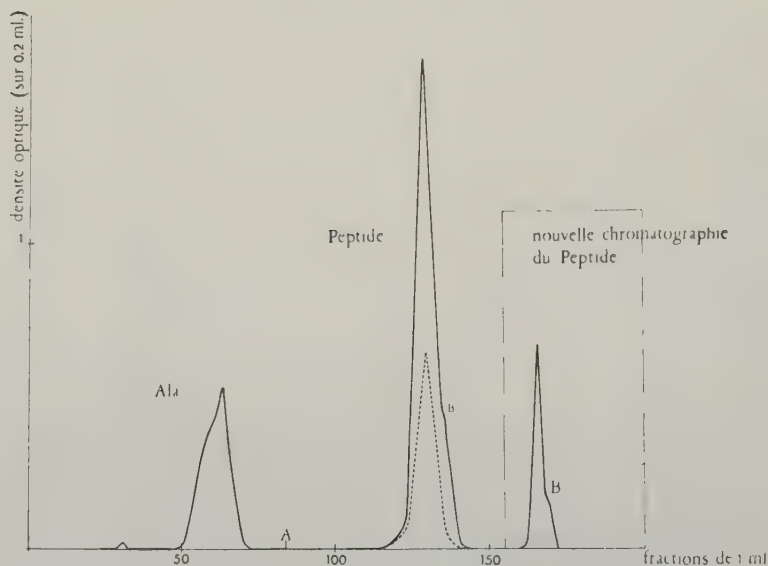
L'étude de l'hydrolyse du peptide bis(α -L-Glu)-*meso*-DAP (IV) par la LAP nous a montré qu'une incubation à 40° prolongée provoque d'importantes réactions secondaires (voir partie expérimentale, chapitre II, 8). Nous avons donc employé une très forte concentration en enzyme et un temps d'incubation court. Dans les conditions données dans le tableau III au bout de 4 heures 30, l'analyse de l'hydrolysate par chromatographie sur papier et sur colonne (figure 13) montre la disparition presque totale du tripeptide (IV) et l'apparition uniquement d'acide glutamique et d'un peptide contenant en quantité équivalente de l'acide glutamique et du *meso*-DAP. Si l'hydrolyse est prolongée nous pouvons mettre en évidence des produits de réactions secondaires, mais dans la courbe d'élution nous ne remarquons pas d'apparition de *meso*-DAP libre (figure 14).

On peut donc conclure que, comme pour le peptide (I), la LAP, dans le cas du peptide (IV), hydrolyse l'acide glutamique lié à la fonction

FIGURE 13

*Séparation sur colonne d'Amberlite CG 120
des produits obtenus par action de la LAP sur le peptide (IV)
bis(α -L-Glu)-meso-DAP*

(Voir légende figure 8)



amine en α du carbone L (liaison L-L) ; mais, pour obtenir l'hydrolyse totale de cette liaison, une beaucoup plus forte concentration en enzyme est nécessaire ; en aucun cas il n'y a hydrolyse de la liaison L-D.

c) *Hydrolyse des liaisons impliquant les fonctions amines et les fonctions carboxyles du meso-DAP :*

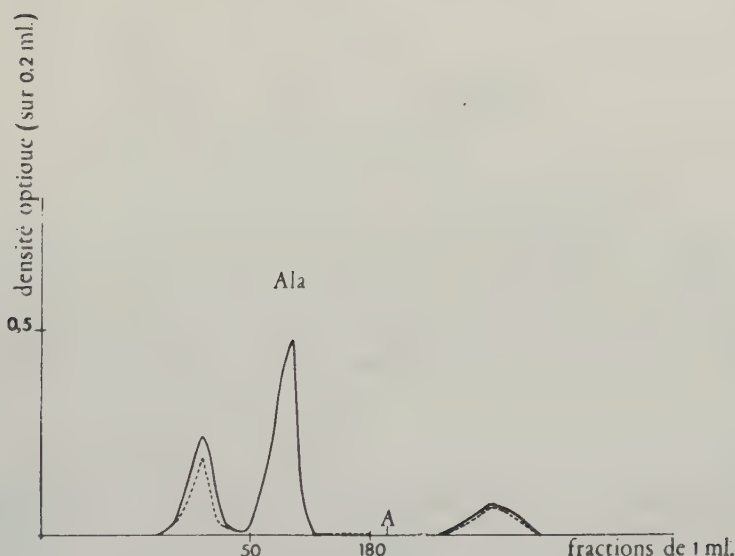
Nous avons soumis à l'action de la LAP le peptide (III) bis(L-Ala)-meso-DAP-bis(L-Ala). La courbe obtenue par dosage à la ninhydrine (figure 15) montre que l'hydrolyse enzymatique est lente même en présence d'une forte concentration d'enzyme. L'analyse de l'hydrolysats lorsque la réaction est terminée, montre la présence de 21,5 μ moles d'alanine et la présence d'un peptide qui, après hydrolyse acide totale, contient 10,2 μ moles de DAP et 20,8 μ moles d'alanine. Deux résidus d'alanine sont donc libérés et deux résidus d'alanine restent liés à la molécule de meso-DAP sous forme de peptide. L'action de la LAP sur ce dernier ne libère plus d'alanine.

L'hydrolyse du peptide (III) est donc plus difficile que celle des

FIGURE 14

Séparation sur colonne d'Amberlite CG 120
des produits obtenus par action de la LAP sur le peptide (IV)
bis(α -L-Glu)-*meso*-DAP (hydrolyse prolongée)

(Voir légende figure 8)



peptides (I) et (II) mais il est possible cependant de détacher deux molécules d'alanine. Vue la spécificité de la LAP, on peut conclure que la première molécule libérée est celle liée à la fonction amine en α du carbone L et la deuxième est celle liée au carboxyle en α du carbone L ; car si l'on suppose que cette deuxième alanine est liée au NH_2 en α du carbone D, le résultat de l'hydrolyse doit être le peptide (II) *meso*-DAP-bis(L-Ala), susceptible encore d'être hydrolysé. Nous sommes donc en présence du L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala. La liaison L-D de cette molécule n'est pas hydrolysée lentement comme dans le cas du peptide L-Ala-(D)*meso*-DAP.

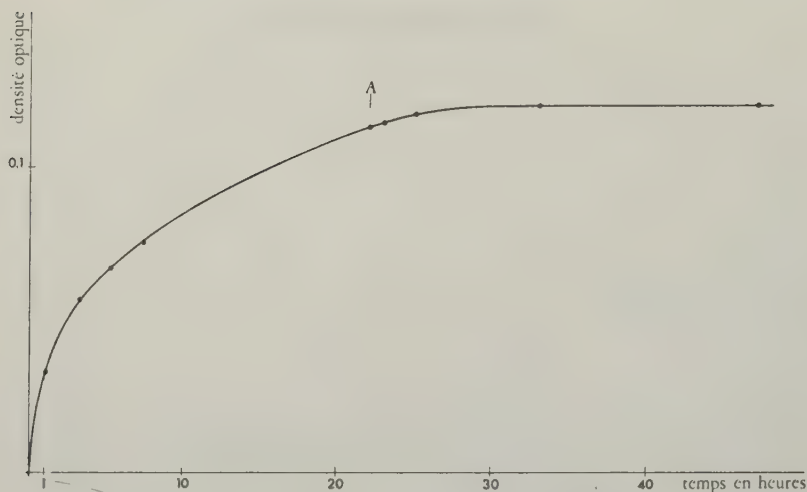
3 - DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus sur l'hydrolyse par la LAP des peptides du *meso*-DAP permettent de tirer les conclusions suivantes : dans le cas où soit les deux fonctions amines, soit les deux fonctions carboxyles du *meso*-DAP sont impliquées dans des liaisons peptidiques avec la L-alanine, l'hydrolyse de la liaison L-L se fait facilement et aussi rapidement dans les deux cas. Ceci montre que la structure de l'acide

FIGURE 15

Hydrolyse par la LAP du peptide (III) bis(L-Ala)-meso-DAP-bis(L-Ala)

(Voir légende figure 7)



aminé N-terminal est aussi importante que celle de l'acide aminé pénultième ; on peut d'ailleurs rapprocher ces résultats de ceux obtenus par SMITH et coll. [99] : la vitesse initiale relative d'hydrolyse du peptide L-Leu-L-Ala est de 64 lorsque celle du peptide L-Ala-L-Leu est de 93.

Par contre, l'existence de liaisons peptidiques simultanément sur les deux fonctions amines et sur les deux fonctions carboxyles du *meso*-DAP diminue beaucoup la vitesse d'hydrolyse. Les résultats obtenus ne nous permettent pas de donner une explication de ce phénomène ; il est cependant probable que ce ralentissement est provoqué par l'encombrement de cette chaîne peptidique, mais nous ne savons pas si la vitesse d'action est diminuée par une certaine difficulté d'atteindre la première ou la deuxième liaison hydrolysée. De toute façon, ce phénomène est à rapprocher de la difficulté d'hydrolyse des chaînes peptidiques au niveau des résidus de L-cystine dont trois ou quatre des groupements polaires sont impliqués dans les liaisons peptidiques (voir ce chapitre, paragraphe 1).

Toutes les liaisons L-L sont donc hydrolysées. Les liaisons L-D le sont lentement et celle dont l'acide aminé D est l'alanine est hydrolysée un peu plus vite que celle dont c'est le *meso*-DAP. En étudiant la spécificité de la LAP, nous avons vu en effet que, pour obtenir une légère hydrolyse des liaisons L-D, l'acide aminé pénultième de configuration D devait avoir une chaîne latérale courte.

Notons que les peptides ayant l'acide L-glutamique à la place de l'alanine sont beaucoup moins sensibles à l'action de la LAP à cause de la présence du α carboxyle dans leur chaîne latérale.

Cette étude nous a permis de préparer les peptides non symétriques suivants :

L-alanyl-(D)*meso*-DAP
meso-DAP(D)-L-alanine
L-alanyl-(D)*meso*-DAP(D)-L-alanine
(α -L-glutamyl)-(D)*meso*-DAP
meso-DAP(D)-(α -L-glutamyl-D-alanine)

Le *meso*-DAP(D)-L-Ala avait déjà été obtenu par action de la carboxypeptidase sur le dérivé dicarbobenzoxylé correspondant ; mais son obtention par action, sur le *meso*-DAP-bis(L-Ala), de la LAP ayant une spécificité très stricte vis-à-vis des liaisons existant dans ce substrat, nous a permis de donner une nouvelle preuve de la structure et de la configuration de ce peptide non symétrique.

Le fait que la LAP puisse hydrolyser une liaison entre un carboxyle du *meso*-DAP N-terminal et l'amine d'un peptide permet de préparer des peptides possédant d'une façon non symétrique des acides aminés D si ces derniers ne sont pas liés directement au *meso*-DAP. Exemple : *meso*-DAP(D)-(α -L-Glu-D-Ala). Par l'action de la carboxypeptidase ceci n'a pas été possible.

Notons encore que cette étude peut permettre d'élucider certains problèmes de structure des peptides obtenus par hydrolyse partielle des mucopeptides. Dans le cas des peptides où l'acide amine lié à la fonction acide ou amine du *meso*-DAP est de configuration L (peptide isolé à partir de certaines cires D des mycobactéries) [44] leur incubation avec la LAP permettra de déterminer la position de cet acide aminé par rapport au carbone L ou D du *meso*-DAP suivant qu'une hydrolyse a lieu ou non. Dans le cas de peptides où l'acide aminé lié au carboxyle du *meso*-DAP est de configuration D, une légère hydrolyse en présence de LAP permet de démontrer que cet acide aminé est en α du carbone L du *meso*-DAP (liaison L-D).

C - PRONASE

Les études précédentes nous permettent d'obtenir des peptides non symétriques du *meso*-DAP possédant la L-alanine, mais il est pratiquement impossible de préparer par cette voie des peptides non symétriques

possédant un acide aminé D, directement lié au *meso*-DAP [exception faite peut-être pour le *meso*-DAP(D)-D-Ala par action de la LAP sur le peptide symétrique énantiomorphe du peptide (II)]. Pour obtenir ces peptides, il faudrait avoir un enzyme dont la stéréo spécificité serait moins stricte que celle des enzymes étudiés précédemment, c'est-à-dire qui hydrolyseraient plus facilement les liaisons L-D ou D-L sans toucher cependant aux liaisons D-D. La pronase, protéase bactérienne isolée à partir de *Streptomyces griseus* par NOMATO et coll. [108] semblait répondre à ces exigences.

1 - SPÉCIFICITÉ

Cet enzyme a une très faible spécificité aussi bien structurale que stérique. Selon NOMATO et coll. [109] c'est une exopeptidase et une endopeptidase, c'est-à-dire que les fonctions carboxyles et amines des substrats peuvent être libres aussi bien que protégées. Les liaisons L-D et D-L sont hydrolysées mais beaucoup plus lentement que les liaisons L-L ; les seules liaisons résistant à l'action de cet enzyme sont les liaisons -CO-NH- des acylaminoacides, les liaisons Gly-Gly, Gly-Pro et les liaisons impliquant le γ -carboxyle de l'acide L-glutamique.

2 - RÉSULTATS

L'hydrolyse enzymatique a été effectuée suivant les indications de NOMATO et coll. [109, 110]. Les substrats sont dissous à une concentration de 0,05 M dans du tampon tris 0,05 M de pH 8,2 en présence de CaCl_2 à une concentration de 0,005 M. L'incubation est faite à 40° en présence de 1,5 mg d'enzyme/ml (soit 0,22 mg d'azote protéique). La libération d'alanine est suivie par chromatographie sur papier de fractions aliquotes.

Dans ces conditions, la liaison L-L du bis(L-Ala)-*meso*-DAP (I) est entièrement hydrolysée au bout de 10 heures ; le tiers environ de la liaison L-L du *meso*-DAP-bis(L-Ala) est hydrolysé au bout de 20 heures. Malheureusement, aucune hydrolyse des liaisons L-D et D-L de ces substrats et de leurs énantiomorphes n'est décelable au bout de 20 heures. L'incubation dans les mêmes conditions de l'amide de la Gly-L-Phe montre une hydrolyse totale au bout de 2 heures.

Cet enzyme a donc la même spécificité vis-à-vis des peptides du *meso*-DAP que la LAP et ne peut pas nous permettre de préparer une plus grande variété de peptides non symétriques.

CHAPITRE III

Préparation de dérivés du *meso* - DAP impliquant une seule des fonctions amines ou carboxyles.

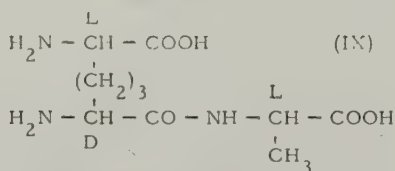
Dans le précédent chapitre, nous avons décrit la préparation de différents peptides non symétriques du *meso*-DAP obtenus par l'action stéréospécifique d'enzymes protéolytiques sur les peptides symétriques. Cette méthode, basée sur le fait que seules les liaisons peptidiques entre deux acides aminés de configuration L (liaison L-L) sont hydrolysées, ne permet pas de préparer des peptides non symétriques de toutes les structures possibles et, en particulier, ceux dont la liaison peptidique avec le *meso*-DAP est en α du carbone L de cet acide aminé. D'autre part, les peptides non symétriques que l'on peut obtenir par cette méthode (liaison peptidique en α du carbone D du *meso*-DAP) ne peuvent pas comporter un acide aminé de configuration D lié directement à une molécule de *meso*-DAP. Pour préparer des peptides non symétriques de structure et de configuration variées, il est nécessaire d'avoir des dérivés du *meso*-DAP dont une seule des fonctions carboxyles ou une seule des fonctions amines soit protégée temporairement ; ceci permet d'introduire ensuite un acide aminé ou un peptide de structure et de configuration voulues par couplage avec la fonction carboxyle ou amine du *meso*-DAP restée libre.

Nous décrirons successivement les possibilités de synthèse que nous avons mises au point pour obtenir un dérivé du *meso*-DAP dont une seule des fonctions amines est protégée et les essais d'hydrolyse enzymatique effectués afin de préparer un dérivé du *meso*-DAP dont une seule des fonctions carboxyles soit protégée par une fonction ester.

A - SYNTHÈSE STÉRÉOSPÉCIFIQUE D'UN DÉRIVÉ MONO-N-ACYLÉ DU *meso*-DAP

Le peptide (IX) *meso*-DAP(D)-L-Ala (figure 16) que nous avons préparé soit par action de la carboxypeptidase sur le bis-*Z-meso*-DAP-bis(L-Ala) (VII) soit par action de la leucine aminopeptidase sur le *meso*-DAP-bis(L-Ala) (II), possède d'une part les fonctions polaires d'un acide α -aminé, d'autre part celles d'un dipeptide. Le problème de l'acylation sélective de l'une de ses fonctions amines correspond à celui de l'acylation sélective d'un acide aminé ou d'un dipeptide à partir d'un mélange équimoléculaire de ceux-ci.

FIGURE 16



meso-DAP(D)-L-Ala

1 - RÉSUMÉ DES ESSAIS PRÉLIMINAIRES DE CARBOBENZOXYLATION D'UN MÉLANGE ÉQUIMOLÉCULAIRE D'ACIDE AMINÉ ET DE DIPEPTIDE EN PRÉSENCE DE CUIVRE

Il est connu depuis longtemps que les acides aminés en solution en présence de cuivre ou d'autres métaux (Zn^{++} , Co^{++} ...) forment des chélates. Dans ces conditions, leur fonction amine est protégée et le traitement par un réactif acylant (carbobenzoxychlorure) ne permet pas de les acyler [126]. Les peptides aussi peuvent former des chélates. Ces composés dont les fonctions sont liées à un atome métallique, formant ainsi un hétérocycle, sont appelés « agents chélatants » [125]. Des études faites par DOBBIE et KERMACK [127, 128] sur les chélates formés entre le cuivre et soit la glycine, soit la glycyl-glycine ou la glycyl-leucine, montrent qu'il ne se forme pas les mêmes complexes dans ces deux cas.

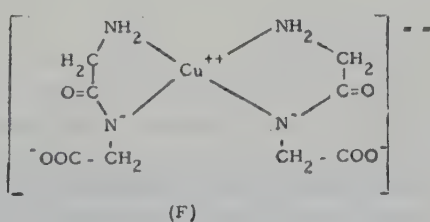
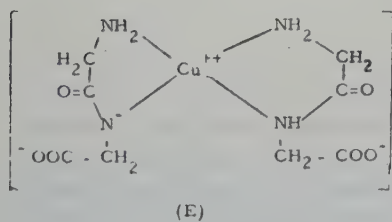
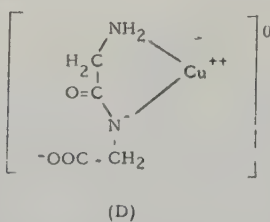
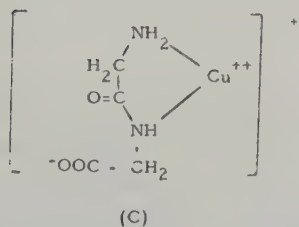
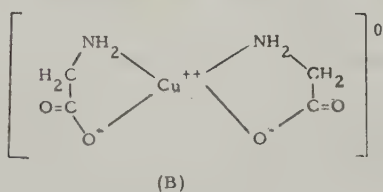
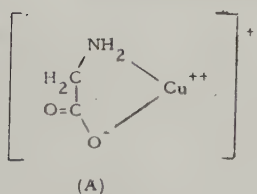
Dans le cas où la glycine [127] est en présence d'une quantité équimoléculaire de cuivre ou d'un excès de ce dernier, il se forme entre pH 3,2 et 6 le complexe (A) (figure 17). Si au contraire, il y a un excès de l'acide aminé, le complexe (A) se forme entre le pH 3,2 et 4,5 puis entre pH 4,5 et 7,6 le complexe (B).

Lorsque la glycyl-glycine [128] est en présence d'une quantité égale ou d'un excès de cuivre, il se fait successivement le complexe (C) et (D) respectivement entre pH 3,9 et 4,7, 4,7 et 7,8. En présence au contraire d'un excès de peptide, les complexes (C), (D), (E), (F) existent successivement entre pH 3,9 et 4,5, 4,5 et 6, 6 et 9, 9 et 11 (figure 17).

Il y a donc une nette différence entre les complexes formés par ces deux catégories d'agents chélatants. Elle provient du fait que, dans le cas des acides aminés, le carboxyle est lié au cuivre et dans le cas d'un dipeptide, la liaison avec le cuivre implique, suivant les auteurs, soit le carbonyle de la liaison peptidique [129, 130] soit son -NH-, soit les deux à la fois [131] ; la liaison peptidique en se ionisant permet donc la formation des deux complexes (D) et (F).

FIGURE 17

*Complexes formés entre la glycine et le cuivre : (A) et (B)
et entre la glycyl-glycine et le cuivre : (C), (D), (E) et (F)
d'après Dobbie et Kermack [127, 128]*



L'existence de ces différents complexes dépend du pH et de la concentration relative du métal et de l'agent chélatant. A pH 7,3, DOBBIE et KERMAK [131] ont pu déterminer des conditions où l'affinité du peptide pour le cuivre est plus grande que celle de l'acide aminé.

Pour résoudre le problème d'acylation sélective d'un acide aminé ou d'un peptide, dans un mélange équimoléculaire de ceux-ci, il faut se mettre dans des conditions de concentration et de pH où non seulement les affinités pour le cuivre de l'acide aminé ou du peptide sont nettement différentes mais aussi où la carbobenzoxylation est possible après cette chélation, c'est-à-dire à pH suffisamment alcalin. Nous avons effectué différentes expériences de chélation d'un mélange équimoléculaire d'alanine et de leucyl-glycine dans des conditions variées; ce chélate est ensuite directement carbobenzoxyté au même pH et l'étude, par chromatographie sur papier, de la partie carbobenzoxytée et de la partie non carbobenzoxytée nous a permis de déterminer la fonction amine impliquée ou non dans un complexe.

De ces essais, nous pouvons conclure que, à pH 11,5, la différence d'affinité d'un acide aminé et d'un dipeptide vis-à-vis du cuivre est grande. A ce pH en présence d'un équivalent de chaque agent chélatant, et d'un demi équivalent de cuivre, le peptide leucyl-glycine est en grande partie sous forme de complexe, mais l'alanine ne l'est pas. En présence d'un équivalent de cuivre, toute la leucyl-glycine est chélatée ainsi qu'un peu d'alanine. Il ressort donc qu'à ce pH, le **peptide** est le **premier à être complexé**.

Le pK de la dissociation du complexe (E) en complexe (F) est de 10 [128]; à pH 11,5 nous sommes donc en présence d'un équilibre entre le complexe (B) et le complexe (F), et cet équilibre est nettement en faveur du complexe (F.).

2 - CARBOBENZOXYLATION SÉLECTIVE DE LA FONCTION AMINE DU *meso*-DAP(D)-L-ALA EN α DU CARBONE L

Les expériences de carbobenzoxylation du *meso*-DAP(D)-L-Ala (IX) en présence de cuivre ont donné des résultats analogues à ceux obtenus à partir d'un mélange équimoléculaire d'alanine et de leucyl-glycine.

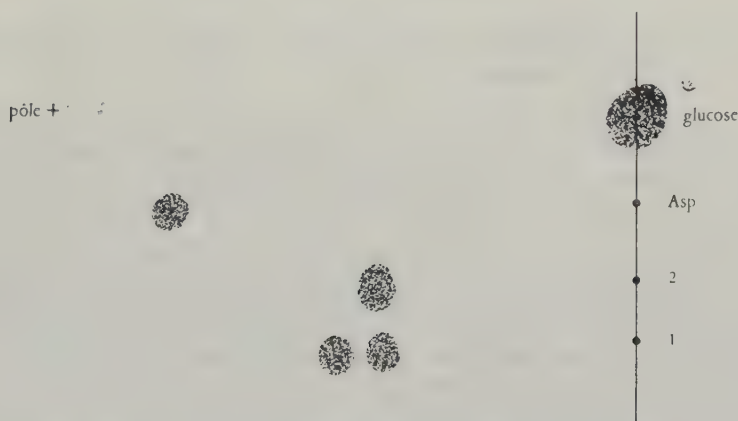
Une différence d'affinité pour le cuivre entre le « dipôle peptidique » et le « dipôle acide aminé » du peptide (IX) doit se révéler par la présence, dans le mélange obtenu après chélation et carbobenzoxylation, d'une beaucoup plus grande quantité de l'un ou l'autre des deux dérivés isomères monocarbenzoxytés du peptide (IX). Ces deux isomères — qu'il est

possible d'obtenir en quantité équivalente par carbobenzoxylation partielle en l'absence de cuivre — peuvent être séparés par électrophorèse sur papier à haut voltage et à pH 3,6. Nous disposons donc ainsi d'un moyen de détecter leur existence (figure 18).

En présence d'un demi équivalent de cuivre à pH 11,5, une carbobenzoxylation exhaustive du peptide (IX) donne un seul dérivé monocarbenzoxylé (figure 18) à côté d'une quantité assez importante de dérivé dicarbenzoxylé et de traces de peptide (IX) libre. En présence

FIGURE 18

Electrophorèse sur papier Whatman n° 3 dans un tampon acétate de pyridine 0,2 M de pH 3,7 pendant 4 h 30 (1.750 volts et 14 mA)



En 1, mélange des deux dérivés monocarbenzoxylés du *meso*-DAP (D)-L-Ala isomères ; en 2, dérivé monocarbenzoxylé obtenu après chélation ; témoins acide aspartique et glucose.

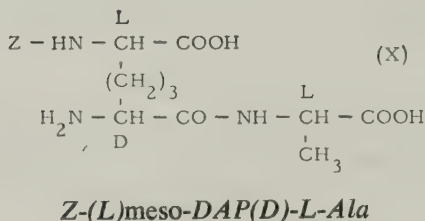
d'un équivalent de cuivre il y a au contraire, à côté de ce même dérivé monocarbenzoxylé, augmentation de la quantité de peptide (IX) non carbobenzoxylé mais très peu de dérivé dicarbenzoxylé. Dans des conditions intermédiaires — 0,75 équivalent de cuivre — le rendement en dérivé monocarbenzoxylé est maximum (47 %) ; par contre, il existe simultanément du peptide dicarbenzoxylé et du peptide (IX) libre *. Ce sont ces conditions que nous avons généralement employées **.

(*) Ces deux produits peuvent être récupérés.

(**) Pour la séparation des différents composants obtenus après carbobenzoxylation, voir partie expérimentale, chapitre II, 10.

D'après les résultats décrits dans le paragraphe précédent, le dérivé monocarbobenzoxylé du peptide (IX) que nous obtenons doit avoir la structure (X) c'est-à-dire celle d'un **dérivé carbobenzoxylé sur la fonction amine en α du carboxyle libre** * (figure 19).

FIGURE 19



Il est cependant nécessaire d'apporter des arguments supplémentaires en faveur de cette structure.

Le caractère distinctif des deux dérivés monocarbobenzoxylés isomères est la position de leur fonction amine libre par rapport à un carboxyle. Dans la structure (X), la fonction amine n'est pas en α d'un carboxyle libre ; par contre, cette disposition existe dans son isomère.

Il est connu depuis longtemps [132] que par chauffage avec la ninhydrine, un acide aminé subit une désamination oxydative. Si la fonction carboxyle est libre et située en α de la fonction amine, il y a aussi décarboxylation ; dans ces conditions, un dégagement de CO_2 est donc caractéristique d'une fonction amine libre en α d'un carboxyle libre [133].

L'évaluation du CO_2 dégagé a été utilisée par VAN SLYKE pour doser les acides aminés selon une méthode manométrique [133] ou titrimétrique [134]. Nous avons employé cette dernière méthode suivant une modification décrite récemment par PATCHORNIK [135] qui permet de suivre le dégagement de CO_2 en fonction du temps de chauffage. Les courbes de la figure 20 représentent la vitesse de dégagement du CO_2 libéré sous l'action de la ninhydrine à partir des acides aminés Ala et DAP, du dipeptide Leu-Gly, du dipeptide (IX), du dérivé carbobenzoxylé de l'alanine et dicarbobenzoxylé du DAP. La courbe obtenue à partir du dérivé monocarbobenzoxylé préparé est tout à fait semblable à celle obtenue

(*) Notons le fait que dans ces conditions, bien que la fonction amine en α du carboxyle libre se complexe sans que toute la fonction amine en α de la liaison peptidique soit chélatée (ceci est montré par la présence simultanée de peptide libre et dicarbobenzoxylé), le dérivé monocarbobenzoxylé sur cette fonction amine n'existe cependant qu'à l'état d'infimes traces.

avec la Leu-Gly : il n'y a aucun dégagement rapide de CO_2 . La fonction amine de ce dérivé n'est donc pas en α d'un carboxyle libre et sa structure est bien celle de la formule (X) (figure 19).

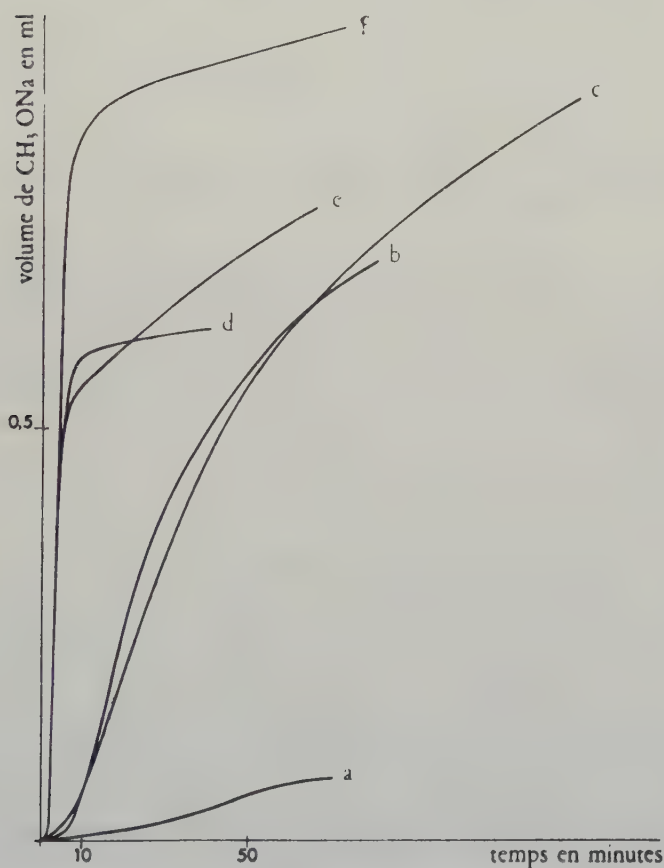
La première application de ce dérivé (X) à des synthèses de peptides non symétriques du *meso*-DAP consiste à introduire sur la fonction amine

FIGURE 20

Dégagement de CO_2 sous l'action de la ninhydrine en fonction du temps de chauffage à 100° à partir de a : Z-Ala et bis-Z-meso-DAP ;

b : Leu-Gly ; c : Z-(L)meso-DAP(D)-L-Ala ; d : Ala ;

e : meso-DAP(D)-L-Ala ; f : meso-DAP



(Le CO_2 dégagé à partir d'environ 0,1 mM d'élément à doser, dissous dans 3 ml de tampon citrate 0,3 M de pH 4,25 sous l'action de 100 mg de ninhydrine, est absorbé par de la benzylamine et titré par une solution de méthoxyde de sodium 0,16 M en présence de bleu de thymol - PATCHORNIK et SHALITIN [135].

en α du carbone D resté libre, un acide aminé ou un peptide de structure et de configuration voulues. Nous avons ainsi estérifié le dérivé (X) par l'alcool benzylique puis couplé la fonction amine libre avec le carboxyle de la Z-L-Ala et obtenu ainsi le diester benzylique du Z-(L), Z-L-Ala-(D) *meso*-DAP(D)-L-Ala (figure 0, nomenclature). Après hydrogénation, nous avons obtenu le peptide L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala.

Cette synthèse montre non seulement l'intérêt de ce dérivé (X), mais elle tend aussi à donner une nouvelle évidence de sa structure. En effet, le peptide obtenu peut être comparé avec le même peptide préparé par action de la leucine aminopeptidase sur la bis(L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) (chapitre II, B) et dont la structure est bien déterminée. Ces deux peptides ont les mêmes valeurs de R_F et les mêmes pouvoirs rotatoires. D'autre part, une incubation de ce peptide L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala obtenu à partir du dérivé (X) avec un excès de leucine aminopeptidase ne libère plus d'alanine. D'après ces résultats, la deuxième molécule de L-alanine est donc bien liée avec la fonction amine en α du carbone D du *meso*-DAP et l'obtention de ce tripeptide par l'intermédiaire du dérivé (X) constitue une preuve supplémentaire que la structure du dérivé mono-Z est bien celle de la formule (X).

Il est intéressant de noter que ce dérivé (X) permet aussi d'obtenir des peptides non symétriques avec la participation de la fonction amine en α du carbone L. En effet, la fonction amine en α du carbone D peut être protégée par un groupement résistant dans les conditions où le groupement Z est éliminé ; après élimination de ce dernier, la fonction amine en α du carbone L devient libre pour être acylée par un acide aminé ou un peptide. En outre, à l'aide de groupements protecteurs appropriés, les deux fonctions amines peuvent être impliquées dans des liaisons peptidiques avec des acides aminés différents.

Nous pouvons donc conclure que l'obtention du dérivé Z-(L)*meso*-DAP(D)-L-Ala semble permettre de résoudre tous les problèmes de synthèse de peptides non symétriques impliquant les fonctions **amines** du *meso*-DAP. Remarquons toutefois la nécessité de la présence d'une molécule d'acide aminé liée à un seul des deux carboxyles du *meso*-DAP. Jusqu'à présent il nous a été seulement possible d'obtenir des peptides ayant des acides aminés L liés au carboxyle D du *meso*-DAP. Il devient donc d'autant plus nécessaire de résoudre le problème de la préparation de peptides non symétriques impliquant chacun des carboxyles du *meso*-DAP.

B - RECHERCHE D'UN ENZYME QUI HYDROLYSE LES ESTERS DU *meso*-DAP

La plupart des protéases ont une action hydrolytique stéréospécifique sur les liaisons esters en α de carbone L. Mais elles ont en général aussi une spécificité très nette soit vis-à-vis de l'acide aminé dont le carboxyle est impliqué dans la liaison ester (chymotrypsine, trypsine), soit vis-à-vis de l'alcool impliqué dans cette liaison (carboxypeptidase).

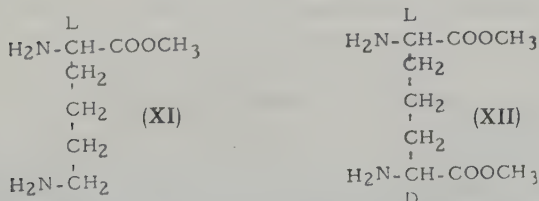
Cependant, une analogie de structure entre la L-lysine et le *meso*-DAP nous a fait penser qu'il y aurait intérêt à étudier l'action estérasique de la trypsine sur les esters du *meso*-DAP. D'autre part, la papaïne, enzyme qui a, dans son action estérasique, une large spécificité vis-à-vis de l'acide aminé et de l'alcool impliqués dans la liaison ester, nous semblait susceptible d'hydrolyser aussi la liaison ester du *meso*-DAP en α du carbone L. Nous étudierons successivement les essais effectués avec ces deux enzymes.

1 - COMPORTEMENT DE LA TRYPSINE VIS-A-VIS DU DIESTER MÉTHYLIQUE DU *meso*-DAP

GOLDENBERG [136] d'une part et WERBEN et PALM [137] d'autre part ont constaté que la trypsine hydrolyse l'ester méthylique de l'arginine et l'ester éthylique de la lysine. En comparant les structures de l'ester méthylique de la L-lysine (XI) et du diester méthylique du *meso*-DAP (XII) (figure 21) on peut se demander si ce dernier pourrait être un substrat pour l'action estérasique de cette protéase. Dans ce cas, l'action de cet

FIGURE 21

*Structure de l'ester méthylique de la L-lysine (XI)
et du diester méthylique du meso-DAP (XII)*



enzyme conduirait à l'hydrolyse de la liaison ester en α du carbone L du *meso*-DAP et laisserait intacte la liaison en α du carbone D.

Les essais d'hydrolyse enzymatique ont été effectués avec une solution du chlorydrate du diester méthylique du *meso*-DAP (0,01 M préalablement neutralisée à pH 7) dans un tampon phosphate 0,2 M. D'après

GOLDENBERG, le pH optimum de l'action estérasique vis-à-vis de l'ester de l'arginine est de 5, 8 ; nous avons donc fait des essais à plusieurs pH compris entre 5 et 8. L'hydrolyse a été suivie par chromatographie sur papier dans le mélange de solvants A.

Dans ces conditions, même à 25°, le pourcentage d'hydrolyse « spontanée » de l'ester (en absence d'enzyme) s'est montré très grand et augmente avec le pH : au bout d'une heure, à pH 8, il y a déjà formation d'une quantité appréciable de DAP par hydrolyse des deux fonctions esters ; par contre à pH 5,2, il n'y a qu'une légère hydrolyse d'une de ces fonctions esters. L'incubation à différents pH de solutions de substrat a montré un degré d'hydrolyse pratiquement identique en présence de quantités variables d'enzyme (0,04 mg de trypsine/ml et 0,08) et en l'absence de celui-ci.

On peut donc conclure à une hydrolyse spontanée rapide des liaisons esters du *meso*-DAP dans ces conditions sans qu'aucune action enzymatique de la trypsine ne soit décelable.

2 - ACTION ESTÉRATIQUE DE LA PAPAÏNE SUR LES ESTERS DU *meso*-DAP

La papaïne est une protéase, isolée à l'état cristallisé par BALLS [138]. Ses substrats spécifiques sont aussi bien ceux de la trypsine, de la pepsine et de la chymotrypsine que ceux de la carboxypeptidase et de différentes autres peptidases [130].

La papaïne a une très forte action hydrolytique sur les esters et encore plus forte sur les thioesters [140]. D'après les études de Mc DONALD et BALLS [141], les esters méthyliques de l'arginine, acylés par le groupement tosyl ou benzoyl sont rapidement hydrolysés ; l'ester méthylique de la benzoyl-glycine est hydrolysé lentement. Par contre, les esters dont la fonction amine est libre ne sont pas hydrolysés. Par conséquent nos essais devront être faits sur un ester protégé du *meso*-DAP.

Le diester méthylique du bis(Z-L-Ala)-*meso*-DAP est dissous dans du méthanol ; on ajoute alors une quantité égale de tampon citrate phosphate de concentration 0,05 M et de pH 5,6, contenant du versène à une concentration de 0,002 M et de la cystine à une concentration de 0,01 M. La concentration finale du substrat est de 0,025 M et celle d'enzyme de 0,08 mg d'azote protéique par ml. L'activité de l'enzyme a été vérifiée par l'incubation de l'ester méthylique de la benzol-glycine dans les mêmes conditions.

Au bout de 3 heures à 37°, le peptide non hydrolysé est extrait par l'acétate d'éthyle en milieu alcalin et le peptide hydrolysé est extrait par le même solvant en milieu acide. Ces deux extraits sont hydrogénés séparément puis chromatographiés sur papier dans le mélange de solvants A.

L'incubation sans enzyme montre la présence de beaucoup de diester non hydrolysé à côté de légères tâches de monoester et d'acide libre. Par contre, l'incubation avec enzyme a hydrolysé tout le diester en monoester et en un peu de diacide.

Nous pouvons donc conclure qu'il y a une hydrolyse spontanée comme précédemment, mais aussi une hydrolyse enzymatique. Pour pouvoir appliquer cette action à la préparation d'un monoester en α du carbone D du *meso*-DAP, il serait nécessaire d'éliminer le phénomène d'hydrolyse spontanée, puis de vérifier la stéréospécificité de cette action.

L'élimination de l'hydrolyse spontanée est peut-être possible d'abord en maintenant le pH à l'aide d'un pHstat [142] ce qui permettrait de ne pas employer de tampon à une forte molarité et ensuite en travaillant avec un ester plus stable (ester éthylique ou propylique) et une plus forte concentration en enzyme.

Cette étude ouvre donc des possibilités de synthèses de peptides non symétriques mais nous n'avons pu encore les mettre à profit.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE PREMIER

Synthèse de Peptides Symétriques du *meso* - DAP

Les points de fusion ont été déterminés en tubes capillaires avec l'appareil du Dr. Tottoli (Ets Büchi, Flawil, Suisse) et ne sont pas corrigés. Les mesures des constantes physiques et les analyses ont été exécutées sur des produits séchés sous un vide de 10^{-2} mm de mercure pendant un temps et à des températures différents indiqués dans chaque cas. Les analyses élémentaires ont été effectuées par les laboratoires de micro-analyse de la Société Ciba à Bâle et par le service de microanalyse de l'Institut de Chimie des Substances naturelles du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette (Seine-et-Oise). Pour la chromatographie sur papier, voir chapitre III, C. Tous les solvants organiques utilisés ont été purifiés et distillés au laboratoire.

Au cours de ces synthèses certaines techniques de purification sont employées à plusieurs reprises ; pour éviter une répétition nous les décrivons ici.

Méthode A. — PURIFICATION A EFFECTUER APRÈS UN COUPLAGE

On évapore sous vide le solvant utilisé pour le couplage ; le résidu est dissous dans un mélange d'eau et de solvant non miscible à l'eau — acétate d'éthyle ou chloroforme —. On lave alors la phase organique trois fois à l'HCl N, trois fois à l'eau, trois fois au KHCO_3 7 % et de nouveau à l'eau jusqu'à pH neutre. La solution organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium anhydre ; puis elle est filtrée et concentrée à sec. Le résidu est alors dissous dans le solvant qui permet la recristallisation.

Méthode B. — PURIFICATION A EFFECTUER APRÈS UN COUPLAGE
AU DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE (DCCI)

On ajoute 0,5 ml d'acide acétique au milieu réactionnel pour détruire l'excès de DCCI et on laisse la précipitation de dicyclohexylurée (DCCU) se compléter à froid pendant une heure. Le précipité (I) formé est alors essoré sur buchner et lavé plusieurs fois par mise en suspension dans le même solvant que celui employé pour la réaction (tétrahydrofurane ou acétonitrile). On élimine ainsi de ce précipité les produits de départ qui n'ont pas réagi. Les solutions sont alors concentrées à sec et le résidu est repris par l'acétate d'éthyle ; les lavages à l'acide et au bicarbonate sont alors effectués selon la méthode A. Le résidu obtenu après évaporation de l'acétate d'éthyle ainsi que le précipité (I) sont dissous dans le minimum de diméthylformamide bouillant ; par refroidissement à 0°, on obtient une première fraction de cristaux de DCCU. En concentrant le diméthylformamide à moitié de son volume sous vide poussé à 40° et en refroidissant on peut obtenir encore une deuxième fraction de DCCU. La solution de diméthylformamide est alors concentrée à sec et le résidu est dissous dans le solvant qui permet la recristallisation.

Méthode C. — PURIFICATION D'UNE SOLUTION DE PEPTIDE
APRÈS HYDROGÉNATION EN PRÉSENCE DE PALLADIUM 5 % SUR CHARBON

Pour éliminer le catalyseur, la solution est filtrée successivement sur filtre plissé de papier Whatman n° 1 et sur tampon de laine de verre et les filtres sont lavés plusieurs fois à l'eau. La solution est alors concentrée sous vide à 35° ; après plusieurs additions et évaporations d'acétone, le résidu est dissous dans un minimum d'eau et le peptide est précipité par addition d'éthanol absolu ; le précipité est centrifugé. On effectue deux ou trois précipitations semblables.

*
* *

1 - PURIFICATION DU *meso*-DAP

Le DAP du commerce (Fluka) possède un pouvoir de $[\alpha]^{20}_D + 4^\circ$ à $+ 6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$, HCl N). Dans le mélange de solvants B, à côté de la tache verte correspondant au *meso*-DAP, nous voyons une tache verte correspondant au L, L-DAP et une tache violette correspondant à la lysine. Les pouvoirs rotatoires de ces deux derniers dérivés sont respectivement de $[\alpha]^{20}_D + 45,0^\circ$ (HCl N) [62] et de $[\alpha]^{21}_D + 25,9^\circ$ (HCl 6 N). Le pouvoir rotatoire du DAP du commerce s'explique donc par la présence de ces deux dérivés. Leur élimination doit conduire à un pouvoir rotatoire de 0° correspondant à celui du *meso*-DAP pur.

On dissout 6,75 g de *meso*-DAP dans 12 ml d'HCl 6 N bouillant ; on laisse refroidir doucement à la température ambiante et, si la cristallisation n'a pas lieu, on la provoque soit par ensencement soit par addition de 2 ou 3 ml d'HCl concentré. On obtient 6,2 g du dichlorhydrate du *meso*-DAP (Rdt 67 %). $[\alpha]^{20}_D$ $0 \pm 1^\circ$ ($c = 1$, HCl N). En laissant les eaux mères séjourner longtemps à la glacière, on peut isoler un deuxième lot de 0,46 g $[\alpha]^{20}_D$ $-1 \pm 1^\circ$ ($c = 1$, HCl N), pur aussi par chromatographie. (Rdt global 72 %.)

2 - DICHLORHYDRATE DU DIESTER MÉTHYLIQUE DU *meso*-DAP

On dissout 12 g (45,5 mM) de dichlorhydrate de *meso*-DAP dans 35 ml de méthanol absolu ; on passe alors du gaz chlorhydrique sec dans la solution qui s'échauffe. Au bout d'une heure et demie, on chasse le méthanol sous vide à 35° , on reprend par le méthanol absolu et on concentre de nouveau *. Par chromatographie sur papier dans le mélange de solvants (A) et révélation à la ninhydrine, on voit que l'estérification n'est pas terminée ; on refait donc passer le gaz chlorhydrique pendant 1 heure et demie. Après quelques heures de glacière, on recueille par filtration un premier lot qu'on lave plusieurs fois à l'éther sec. On obtient 10,5 g $F = 192-194^\circ$ (78 %)**. Par addition d'éther sec dans les eaux mères, on obtient une nouvelle cristallisation, pesant 2,4 g ; son point de fusion est seulement de $176-178^\circ$. (Rdt total 97 %.)

Pour l'analyse ce produit est recristallisé deux fois dans le mélange méthanol-éther $F = 197,5-198,5^\circ$.

Analyse sur le produit séché 15 heures à 61° :



Calculé % :	C	37,12	H	6,93	N	9,62	Cl	24,35
Trouvé % :		37,08		6,89		9,65		24,09

(*) Des essais par la méthode de BRENNER [63] ne se sont pas montrés fructueux.

(**) GREENSTEIN et coll. [53] ont estérifié le DAP de synthèse et l'ont décrit comme une huile.

3 - DIBENZÈNE SULFONATE DU DIESTER BENZYLIQUE DU *meso*-DAP *

Ce dérivé a été préparé selon la méthode de CIPERA [64] avec la modification apportée par MAC LAREN [65]. On dissout à chaud dans 35 ml d'alcool benzylique 5,95 g (22,6 mM) de dichlorhydrate du *meso*-DAP en présence de 8 g d'acide benzène-sulfonique ; on ajoute alors 140 ml de tétrachlorure de carbone. La solution est distillée à reflux pendant 8 heures sur un bain-marie dans un appareil de Soxhlet contenant une cartouche de MgSO_4 anhydre. La cinétique, suivie par chromatographie sur papier dans le solvant (A), montre qu'au bout de cinq heures la réaction est terminée. Après une nuit à la glacière, l'ester cristallise ; on filtre les cristaux qu'on lave abondamment à l'éther ; on obtient 10,96 g $F = 163,5-165^\circ$ (Rdt 71 %). Par addition d'une nouvelle quantité de tétrachlorure de carbone, on obtient un deuxième lot pesant 1,93 g $F = 159,5-163^\circ$ (Rdt total 83 %). Après une recrystallisation dans le mélange éthanol absolu-éther, le point de fusion monte à $164-165,5^\circ$.

Analyse sur le produit séché 18 heures à 80° :

$$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{10}\text{N}_2\text{S}_2 = 685,82$$

Calculé % :	C	57,71	H	5,58	N	4,08	S	9,34
Trouvé % :		57,71		5,59		4,31		9,31

4 - DIESTER MÉTHYLIQUE DU N, N'-BIS-Z-*meso*-DAP

On met en suspension 2,3 g de N, N'-bis-Z-*meso*-DAP [62] (5 mM) dans 50 ml d'une solution anhydre de diazométhane ** dans l'éther (obtenue selon la méthode de ARNDT à partir de la nitrosométhylurée [66]. Au bout d'une demi-heure, tout est dissous. Lorsque le dégagement d'azote est terminé on concentre la solution à sec et le diester brut, sous forme d'huile, est directement utilisé pour l'étape suivante.

5 - DIHYDRAZIDE DU N, N'-BIS-Z-*meso*-DAP

Il est préparé selon la méthode utilisée par ERLANGER [67] pour les dérivés de l'alanine. L'huile précédente est dissoute dans 75 ml d'éthanol anhydre ; on ajoute alors goutte à goutte 0,7 ml d'hydrazine hydrate à 98 % (14 mM) et on laisse la nuit à température ordinaire. Le dihydrazide se prend en masse ; le gel est essoré, lavé à l'éthanol froid. On obtient 1,96 g (Rdt 81 % calculé sur le N, N'-bis-Z-*meso*-DAP de départ)

(*) Nous remercions le Dr Ch. Gansser pour son aide dans cette synthèse.

(**) Nous remercions M. Mercier (I.C.S.N.-Gif) d'avoir effectué cette synthèse pour nous.

F = 158-170°. On dissout le précipité dans un assez grand volume de butanol ; par refroidissement on obtient 820 mg (42 %) F = 193-195° ; après une légère concentration des eaux mères et addition d'éther, on peut récupérer 970 mg F = 141-155°.

L'analyse est faite sur le premier lot séché 24 heures à 70° :

	$C_{23}H_{30}O_6N_6 = 486,52$				
Calculé % :	C	56,77	H	6,21	N 17,27
Trouvé % :		56,59		6,41	17,56

6 - DIESTER BENZYLIQUE DU N, N'-BIS-Z-*meso*-DAP-BIS(D-ALANINE)

a) *Par les anhydrides mixtes :*

On dissout 1,4 g (3 mM) de N, N'-bis-Z-*meso*-DAP [62] dans 8 ml de tétrahydrofurane dépéroxydé anhydre. La solution est refroidie à — 10° et on ajoute alors goutte à goutte sous agitation forte 0,85 ml (6 mM) de triéthylamine anhydride redistillée et 0,79 ml (6 mM) de chlorocarbonate d'isobutyle redistillé. Le mélange est conservé à — 10° avec agitation sous exclusion de l'humidité pendant 15 minutes. On ajoute alors lentement une solution refroidie de l'ester benzylique de la D-alanine (obtenue à partir de 2,74 g (7,8 mM) de son *p*-toluènesulfonate [64] par la méthode de HILLMANN [68]. Le mélange réactionnel est laissé une nuit à température ordinaire. Les purifications sont alors faites suivant la méthode A.

Le résidu après évaporation du chloroforme est repris dans un assez grand volume d'éthanol absolu chaud ; le produit de couplage précipite rapidement sous forme de gel, devenant compacte à la glacière. Après filtration on obtient 1,42 g (Rdt 60 %) de F = ramollissement : 143° Fus. 145-148°. Après une nouvelle recristallisation, le point de fusion devient 147,5-149°.

Analyse sur le produit séché 16 heures à 80° :

	$C_{43}H_{48}O_{10}N_4 = 780,84$				
Calculé % :	C	66,14	H	6,19	N 7,17
Trouvé % :		65,87		6,22	7,21
$[\alpha]^{19}_D + 13,4 \pm 2^\circ$ (c = 1,4 diméthylformamide)					

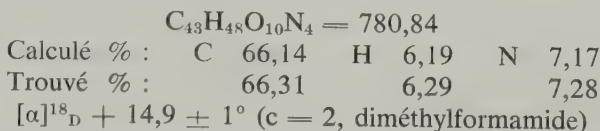
b) *Par le DCCI :*

On met en suspension 1,85 g (4 mM) de N, N'-bis-Z-*meso*-DAP dans 9 ml d'acétonitrile anhydre. On ajoute alors une solution de l'ester benzylique de la D-alanine (obtenue à partir de 2,1 g (9,6 mM) de son chlorhydrate par la méthode de HILLMANN) dans 20 ml d'acétonitrile. A la solution refroidie à — 10°, on ajoute alors sous agitation forte 2,15 g

(10,4 mM) de DCCI dissous dans l'acétonitrile. A cette température, la précipitation de DCCU se fait lentement. On laisse à -5° pendant 2 heures et une nuit à $+4^{\circ}$. Les purifications sont alors faites suivant la méthode B.

On obtient deux lots de DCCU ; le premier lot pèse 1,68 g et fond à 231-232° et le deuxième lot pèse 100 mg et fond à 225-226° (rendement total en DCCU 76 %). Le résidu après évaporation du diméthylformamide est repris dans de l'éthanol absolu chaud comme précédemment et précipité à froid. On obtient 2,65 g (85 %) F = ramollissement : 146°, fusion 147-149,5°. Une nouvelle recristallisation monte le point de fusion à 150-151,5°. Une recristallisation dans l'acétate d'éthyle ne change pas le point de fusion. Par contre, après dissolution dans le tétrahydrofurane de 1 g et un long séjour à la glacière, on obtient des cristaux pesant 0,76 g ; leur point de fusion est de F = 166,5-167,5° (Rdt 76 %). Par addition d'eau dans les eaux mères, on obtient une deuxième fraction de 100 mg - F = 166,5-167,5° (Rdt total de la recristallisation 86 %.)

Analyse sur le produit séché 16 heures à 80° :

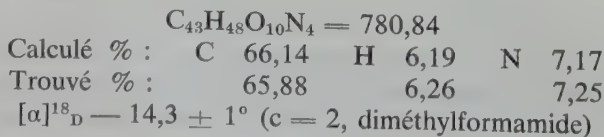


7 - DIESTER BENZYLIQUE DU N, N'-Z-*meso*-DAP-BIS(L-ALANINE)

a) *Par le DCCI :*

En partant de 1,84 g (4 mM) de N, N'-bis-Z-meso-DAP, 3,65 g (10,4 mM) de *p*-toluène sulfonate de l'ester benzylique de la L-alanine et de 2,14 g (10, mM) de DCCI, on obtient, de la même façon que précédemment, 2,1 g de DCCU (F = ramollissement : 220°, fusion 231-232°) (Rdt 90 %) et 2,47 g du dérivé peptidique (Rdt 79 %) de F = ramollissement : 138°, fusion 145-149°. Une recrystallisation dans l'éthanol absolu donne 2,25 g de F = 147-152° et une recrystallisation dans le tétrahydrofurane donne 1,98 g F = 166-167,5°, soit un rendement final en dérivé peptidique pur de 63,5 %.

Analyse sur le produit séché 16 heures à 80° :



b) *Par la méthode aux azides :*

On dissout 730 mg (1,5 mM) du dihydrazide du N, N'-bis-Z-*meso*-DAP ($F = 193-195^\circ$) dans 3 ml d'HCl N (3 mM) ; on ajoute 1 ml d'acide acétique glacial et on refroidit à -5° en agitant vigoureusement ; une solution de 220 mg (3,2 mM) de NaNO_2 , dissous dans le minimum d'eau, est alors ajoutée goutte à goutte ; le diazide qui précipite, semble avoir tendance à cristalliser ; on l'extrait rapidement à froid par de l'acétate d'éthyle ; la phase organique est lavée successivement à l'eau, au NaHCO_3 3 %, et à l'eau, séchée 20 minutes sur MgSO_4 et ajoutée lentement à une solution étherée de l'ester benzylique de la L-alanine (préparée à partir de 906 mg (4,2 mM) de son chlorhydrate). On laisse alors une nuit à température ordinaire ; un léger précipité se forme qui est filtré et son point de fusion ($173-185^\circ$) indique que l'on est en présence d'un petit lot de N, N'-bis-Z-*meso*-DAP-dihydrazide qui n'a pas réagi. La solution organique est ensuite traitée suivant la méthode A. Par précipitation dans l'acétate d'éthyle entre chaud et froid, on obtient 600 mg (Rdt 51 %), $F =$ ramollissement : 139° , fusion $141-147^\circ$. Par précipitation des eaux mères par de l'hexane, on récupère encore 132 mg (Rdt 63 %), $F = 120-130^\circ$. Le premier lot ne cristallise pas dans le tétrahydrofur même si l'on essaye d'induire la cristallisation par des cristaux ; cependant par addition d'eau dans le tétrahydrofur, le produit précipité : $F = 145-149^\circ$.

8 - N, N'-BIS-Z-*meso*-DAP-BIS-(L-ALANINE)

820 mg (1,05 mM) du diester benzylique du N, N'-bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala) sont dissous dans 30 ml de dioxanne dépéroxydé en présence de 0,625 ml de NaOH 4 N (2,5 mM). Après 2 heures à 20° , la solution est diluée à 100 ml avec de l'eau ; on évapore le dioxanne sous vide à 30° et la solution aqueuse restante est refroidie, puis acidifiée jusqu'à réaction Congo positif ; un trouble se forme qui devient un gel après une nuit à la glacière. Le précipité est essoré et lavé plusieurs fois par mise en suspension dans l'eau. On obtient 587 mg (Rdt 93 %).

Ce produit présente une anomalie de point de fusion, vue nettement au microscope Kofler : aux environs de 155° , ce dérivé fond lentement, puis si on laisse monter doucement la température, la masse fondue se solidifie en aiguilles. Ces aiguilles fondent à $186-188,5^\circ$. Par une nouvelle précipitation dans l'éthanol absolu, le deuxième point de fusion monte à $188-189,5^\circ$. Ce produit, séché sur P_2O_5 et paraffiné sous 10^{-2} mm de Hg pendant 20 heures à 110° , conserve ce changement de forme cristalline et son analyse correspond à celle du produit sans molécule de solvation.

Il s'agit donc d'une transformation par la chaleur de la forme précipitée en une forme cristalline.

Analyse : $C_{29}H_{36}O_{10}N_4 = 600,6$

Calculé % : C 57,98 H 6,04 N 9,33

Trouvé % : 57,55 6,10 9,36

$[\alpha]^{20}_D - 4 \pm 1^\circ$ (c = 2 diméthylformamide)

$[\alpha]^{20}_D - 7,3 \pm 1^\circ$ (c = 1,4 NaOH N)

9 - N, N'-BIS-Z-*meso*-DAP-BIS(D-ALANINE)

Ce produit est obtenu de la même façon que son énantiomorphe avec un rendement de 85 %.

$[\alpha]^{19}_D + 4,2 \pm 1^\circ$ (c = 2,07 diméthylformamide)

$[\alpha]^{20}_D + 6,9 \pm 2^\circ$ (c = 1,03 NaOH N)

10 - *meso*-DAP-BIS(D-ALANINE)

On dissout 300 mg du diester benzylique de la N, N'-bis-Z-*meso*-DAP-bis(D-alanine) (0,38 mM) dans 17 ml d'acide acétique redistillé et on ajoute 2 à 3 ml d'eau. La solution est ensuite hydrogénée, sous agitation, en présence d'une préparation de palladium 5 % sur charbon (provenance des « Baker catalyts ») dans un courant d'hydrogène. Au bout de 1 heure 30 le dégagement de CO_2 est terminé ; on laisse encore 1 heure en vase clos. Après les purifications selon la méthode C, on obtient 123 mg d'un précipité pulvérulent, légèrement hygroscopique (Rdt 98 %), qui fond à une température plus haute que 300° .

Analyse sur le produit séché 18 heures à température ordinaire et 3 heures à 110° :

$C_{13}H_{24}O_6N_4 = 332,35$

Calculé % : C 46,98 H 7,28 N 16,87

Trouvé % : 46,80 7,40 16,90

$[\alpha]^{20}_D + 47,7 \pm 1^\circ$ (c = 2, HCl 0,1 N)

11 - *meso*-DAP-BIS(L-ALANINE)

Ce dérivé est obtenu de la même façon que son énantiomorphe ; à partir de 210 mg (0,27 mM) du diester benzylique de la N, N'-bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-alanine), on obtient 79 mg (89 %) de tripeptide légèrement hygroscopique.

Analyse sur le produit séché 18 heures à température ordinaire et 3 heures à 110° :

$$C_{13}H_{24}O_6N_4 = 332,35$$

Calculé % :	C	46,98	H	7,28	N	16,87
Trouvé % :		47,10		7,47		16,66
[α] ¹⁸ _D — 48,2 ± 1° (c = 2, HCl 0,1 N)						

12 - DIESTER MÉTHYLIQUE DE LA N, N'-BIS(Z-L-ALANYL)-*meso*-DAP

On dissout 2,95 g (13,2 mM) de carbobenzoxy-L-alanine [69] dans du tétrahydrofurane sec que l'on salifie par 1,9 ml (13,2 mM) de triéthylamine ; à cette solution refroidie à — 10°, on ajoute alors 1,73 ml (13,2 mM) de chlorocarbonate d'isobutyle et on laisse 5 minutes sous agitation. Une solution de l'ester méthylique du *meso*-DAP dans le tétrahydrofurane (préparé à partir de 1,75 g (6 mM) de son dichlorhydrate et 1,7 ml (12 mM) de triéthylamine) est ajoutée alors goutte à goutte ; le mélange est laissé 3 heures sous agitation à température ordinaire, puis chauffé 5 minutes à 50°. Les purifications sont faites ensuite suivant la méthode A. Le résidu, après évaporation de l'acétate d'éthyle, est précipité entre chaud et froid dans ce même solvant ; on obtient 2,72 g (Rdt 73 % calculé sur l'ester du *meso*-DAP), F = 129-132°. Après une deuxième recristallisation dans l'acétate d'éthyle, le point de fusion monte à 134-136°. Nous avons obtenu, une ou deux fois, par recristallisation toujours dans l'acétate d'éthyle entre chaud et froid, un lot qui fond entre 146° et 151°. Par examen au microscope Kofler, nous avons pu voir, comme pour le dérivé bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala), un ramollissement à 136°, une transformation en cristaux et une nouvelle fusion à 146-151°.

Analyse sur le produit séché 20 heures à 80° :

$$C_{13}H_{40}O_{10}N_4 = 628,66$$

Calculé % :	C	59,22	H	6,41	N	8,91
Trouvé % :		59,16		6,46		9,05
[α] ¹⁷ _D + 7,5 ± 1° (c = 2 diméthylformamide)						

13 - DIESTER MÉTHYLIQUE DE LA N, N'-BIS(Z-D-ALANYL)-*meso*-DAP

Selon le mode opératoire précédent, la Z-D-alanine 3,925 g (17,2 mM) est couplée avec 2,325 g (8 mM) de diester méthylique du *meso*-DAP. (Rdt 74 %), F = 135,5-137,5°.

Calculé % :	C	59,22	H	6,41	N	8,91
Trouvé % :		59,49		6,57		9,06

$[\alpha]_D^{25} - 6,9 \pm 1^\circ$ ($c = 2$ diméthylformamide)

On dissout 2,83 g (4,5 mM) du diester méthylique de la N, N'-bis (Z-D-Ala)*meso*-DAP dans 40 ml de méthanol en présence de 2,8 ml de NaOH 4 N (10,8 mM). La solution est agitée pendant 2 heures 30 à température ordinaire, puis diluée avec de l'eau ; le méthanol est alors évaporé sous vide. La solution est acidifiée à l'HCl concentré sous agitation et refroidissement jusqu'à Congo positif. Le dérivé saponifié précipite puis est essoré et lavé abondamment à l'eau glacée ; on obtient 2,32 g (86 %), $F = 141-144^{\circ}$. Le produit est très peu soluble dans l'acétate d'éthyle anhydre, mais soluble en présence d'eau ; on recrystallise donc une partie dans l'acétate d'éthyle saturé d'eau : le point de fusion devient $95-110^{\circ}$ (forme A). Une autre partie est triturée dans l'acétate d'éthyle chaud et son point de fusion monte alors à $146,5-148^{\circ}$ (forme B). Le lot A recrystallisé de nouveau dans l'acétate d'éthyle saturé d'eau conserve le même point de fusion.

Pour exclure l'éventualité de la formation d'un complexe d'inclusion entre le peptide et le Na, nous avons traité la forme B dans les conditions décrites [70, 71, 72] pour obtenir le peptide sans sel à point de fusion élevé. On dissout 485 mg de la forme B dans le NaOH 0,1 N et la solution est versée sous agitation forte et refroidissement dans un excès d'HCl 3 N ; le dérivé peptidique précipite et est extrait à l'acétate d'éthyle ; la phase organique est alors lavée trois fois à l'HCl 3 N, à l'eau et séchée. La solution est concentrée et le résidu est dissous dans le minimum d'acétate d'éthyle chaud. Par refroidissement, on obtient 328 mg d'un produit qui fond à 90-110° (forme A). Nous avons donc obtenu, même dans ces conditions, la forme à point de fusion bas. Les points de fusion des formes A et B, séchées 20 heures à 80°, restent constants et leur analyse élémentaire, dans ces conditions, n'a montré aucune présence de solvant ni aucun résidu incombustible.

Forme A :	C	57,64	H	6,05	N	9,56
Forme B :		57,83		6,0		9,54

Les valeurs calculées pour $C_{29}H_{36}O_{10}N_4 = 600,61$ sont :

$[\alpha]^{14}_D - 11,3 \pm 1^\circ$ (c = 2 diméthylformamide) C 57,99 H 6,04 N 9,33

15 - N, N'-BIS(Z-L-ALANYL)-*meso*-DAP

Par saponification de 2,5 g (4 mM) du diester méthylique correspondant, en présence de 2,2 ml de NaOH 4,5 N (9,6 mM), on obtient 1,97 g (Rdt 82,5 %), $F = 103-112^{\circ}$ (forme A). Par recristallisation dans l'acétate d'éthyle saturé d'eau, on obtient un point de fusion de $147-148,5^{\circ}$ (forme B). Une nouvelle recristallisation dans ce même solvant, avec ensemencement par la forme A, donne le point de fusion de la forme B. Par contre, la forme A recristallisée dans l'acétate d'éthyle anhydre, donne la forme A.

Analyse : $C_{29}H_{36}O_{10}N_4 = 600,61$

Calculé % :	C	57,99	H	6,04	N	9,33
Trouvé % :		57,78		6,02		9,40

$[\alpha]^{16}_D = 10,4 \pm 1,5^{\circ}$ ($c = 2$ diméthylformamide)

16 - N, N'-BIS(L-ALANYL)-*meso*-DAP

On hydrogène 650 mg (1,08 mM) de N, N'-bis(Z-L-Ala)-*meso*-DAP (forme A) dans du méthanol contenant un peu d'eau et quelques gouttes d'acide acétique, en présence de palladium 5 % sur charbon, pendant 3 heures. La solution est traitée ensuite suivant la méthode C. On obtient 335 mg (Rdt 93 %) de N, N'-bis(L-Ala)-*meso*-DAP, sous forme d'un produit très hygroscopique. Son point de fusion est supérieur à 300° .

Analyse sur le produit séché 7 heures à 110° :

$C_{13}H_{24}O_6N_4 = 332,35$

Calculé % :	C	46,98	H	7,28	N	16,87
Trouvé % :		46,64		7,46		16,85

$[\alpha]^{16}_D + 12,8 \pm 1,5^{\circ}$ ($c = 2$, HCl 0,1 N)

17 - N, N'-BIS(D-ALANYL)-*meso*-DAP

Ce peptide a été obtenu par hydrogénation de la N, N'-bis(Z-D-Ala)-*meso*-DAP selon le mode opératoire précédent. (Rdt 89 %.)

Analyse : $C_{13}H_{24}O_6N_4 = 332,35$

Calculé % :	C	46,98	H	7,28	N	16,87
Trouvé % :		46,53		7,30		16,88

$[\alpha]^{15}_D - 12,4^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$ ($c = 2$, HCl 0,1 N)

18 - TÉTRA-ESTER BENZYLIQUE DU N, N'-BIS

(α -Z-L-GLUTAMYL)-*meso*-DAP

a) *Par la méthode au DCCI :*

On dissout 1,485 g (4mM) de l'ester γ -benzylique du Z-L-Glu [73] dans 15 ml d'acétonitrile redistillé et on refroidit à 0° ; on ajoute alors l'ester benzylique du *meso*-DAP dans 10 ml d'acétonitrile (obtenu à partir de 1,4 g (2 mM) de son benzène sulfonate par la méthode de Hillmann), puis sous agitation forte, 0,9 g de DCCI (4,4 mM) dans le minimum d'acétonitrile. On laisse 4 heures à température ordinaire ; les purifications sont alors faites suivant la méthode B. On obtient deux lots de DCCU. Le premier pèse 0,83 g et fond à 232-234°. Le deuxième pèse 100 mg et fond à 200°. (Rdt total en DCCU : 94 %.)

Le résidu, après évaporation du diméthylformamide, est repris dans le minimum d'acétate d'éthyle bouillant ; après une nuit à la glacière, on filtre 1,47 g du tétraester benzylique (Rdt 65 %). F = ramollissement : 109°, fusion 115-122°. Par précipitation des eaux mères par de l'hexane, on obtient 200 mg, F = 104-110°. (Rdt global 75 %.)

Le premier lot est recristallisé successivement dans l'acétate d'éthyle (F = ramollissement : 113°, fusion 116-120°) et dans l'acétonitrile (F = ramollissement : 116°, fusion 119-123°).

Analyse sur le produit séché 16 heures à 60° :

$$\text{C}_{61}\text{H}_{64}\text{O}_{14}\text{N}_4 = 1.077,15$$

Calculé % :	C	68,01	H	5,98	N	5,20
Trouvé % :		67,98		6,04		5,43
[α] ¹⁸ _D — 1 $\pm$ 1° (c = 2 diméthylformamide)						

b) *Par la méthode aux anhydrides mixtes :*

On dissout 1,56 g (4,2 mM) de γ -ester benzylique de la Z-L-Glu dans le tétrahydrofurane en présence de 0,592 ml (4,2 mM) de triéthylamine. On ajoute alors sous refroidissement à — 10°, 0,550 ml (4,2 mM) de chlorocarbonate d'isobutyle ; on laisse 10 minutes sous agitation forte à cette température, puis on ajoute la solution du diester benzylique du *meso*-DAP dans le tétrahydrofurane (obtenu à partir de 1,4 g (2 mM) de son benzène sulfonate). On laisse 1 heure 30 à température ordinaire et on chauffe 5 minutes à 50°. Les purifications sont alors effectuées selon la méthode A. Par recristallisation dans l'acétate d'éthyle, on obtient 1,90 g (Rdt 88 %) du tétraester benzylique, F = 118-124°. Par recristallisation dans l'acétonitrile, on obtient 1,55 g (82 %), F = 119-123°.

[α]²²_D — 1,5° $\pm$ 1° (c = 2, diméthylformamide)

19 - N, N'-BIS(α -L-GLUTAMYL)-*meso*-DAP

On dissout 500 mg (0,46 mM) du dérivé précédent dans 15 ml d'acide acétique et 2 ml d'eau et on hydrogène en présence de palladium 5 % sur charbon. La solution est ensuite traitée suivant la méthode C. On obtient après deux précipitations 208 mg (Rdt 90 %).

Analyse sur le produit séché 3 heures à température ordinaire :

	$C_{17}H_{28}O_{10}N_4, 2,5 H_2O = 493,42$		
Calculé % :	C 41,37	H 6,75	N 11,35
Trouvé % :	41,60	7,05	11,11
$[\alpha]^{22}_D + 39,2 \pm 1,5^\circ$ (c = 2, HCl 0,1 N)			

20 - DIHYDRAZIDE DU N, N'-BIS(Z-L-ALANYL)-*meso*-DAP

On dissout 2,512 g (4 mM) du diester du N, N'-bis(Z-L-Ala)-*meso*-DAP dans 50 ml de méthanol ; on ajoute alors 0,8 ml (16 mM) d'hydrazine hydrate (98 %) et on laisse 48 heures à température ordinaire ; le dihydrazide précipite au cours de la réaction sous forme de gel. Après une heure à la glacière on recueille le précipité sur le filtre et on le lave au méthanol froid. On obtient 2,05 g (Rdt 81,5 %), F = 192-203°. Par précipitation des eaux mères avec de l'éther, on obtient encore 60 mg. F = 192-202° (Rdt 84 %).

Par recristallisation dans le butanol, on obtient un point de fusion de 193-198°.

Analyse sur le produit séché 20 heures à 80° :

	$C_{29}H_{40}O_8N_8 = 628,68$		
Calculé % :	C 55,40	H 6,41	N 17,82
Trouvé % :	56,72	6,62	16,08

L'analyse montre donc qu'il s'agit là d'un produit impur. Si l'on recristallise par contre 100 mg dans 50 ml d'éthanol absolu, on obtient 20 mg de produit insoluble à chaud. F = 210-214°, et 35 mg cristallisant à froid. F = 200-208,5°. L'analyse du premier lot donne les résultats suivants :

C	55,81	H	6,75	N	17,55
---	-------	---	------	---	-------

Nous obtenons donc seulement 20 à 50 % de produit analytiquement pur.

$$[\alpha]^{22}_D + 1,2 \pm 1^\circ \quad (c = 2,25, \text{ diméthylformamide})$$

21 - DIESTER MÉTHYLIQUE DE LA N, N'-BIS-Z-*meso*-DAP-BIS
(L-ALANINE)

a) *Par la méthode au DCCI :*

On dissout 7,87 g de N, N'-bis-Z-*meso*-DAP (17,2 mM) dans 50 ml d'acétonitrile et on refroidit à 0°. On ajoute alors une solution refroidie de l'ester méthylique de la L-alanine (obtenue à partir de 5,28 g de son chlorhydrate (37,8 mM) [74]) dans 30 ml de tétrahydrofuranne et 7,8 g de DCCI (37,8 mM) dans l'acétonitrile. On laisse alors, sous agitation, 14 heures à 4° et 5 heures à température ordinaire. Les purifications sont alors faites suivant la méthode B.

On obtient deux lots de DCCU. Le premier pèse 6,2 g, fusion 226-227°. Le deuxième pèse 1,34 g, fusion 209-215° (Rdt DCCU 85 %). Le résidu, après évaporation du diméthylformamide, est trituré dans le méthanol chaud ; par filtration de cette suspension, on isole 2,4 g de dérivé peptidique qui fond en se ramollissant à 210°, F = 216-217,5°. Par refroidissement du méthanol, on obtient encore un lot de 0,6 g, F = ramollissement : 205°, fusion 211-214°. Mais par addition d'eau dans les eaux mères on obtient la précipitation d'une huile ; cette huile qui ne se solidifie pas, a été dissoute dans le chloroforme chaud, et par refroidissement, nous avons isolé 0,68 g d'un produit de F = ramollissement : 114°, fusion 187-190° (brunissement). Toute autre cristallisation s'est montrée infructueuse. (Rdt total 35%.) Par recristallisation dans le diméthylformamide du premier lot, on obtient des cristaux de fusion 220-221,5°.

Analyse sur le produit séché 16 heures à 80° :

	$C_{31}H_{40}O_{10}N_4 = 628,66$		
Calculé % :	C 59,23	H 6,41	N 8,91
Trouvé % :	59,14	6,42	8,71
$[\alpha]^{18}_D$ —	$14,3 \pm 1^\circ$ (c = 1,2 diméthylformamide)		

b) *Par la méthode aux anhydrides mixtes :*

On dissout 3,9 g (8,5 mM) de N, N'-bis-Z-*meso*-DAP dans 20 ml environ de tétrahydrofuranne ; on ajoute alors 2,4 ml (17 mM) de triéthylamine, et à — 10°, 1,7 ml (17 mM) de chlorocarbonate d'éthyle ; on laisse 20 minutes à cette température et sous agitation forte. On ajoute alors une solution dans le tétrahydrofuranne de l'ester méthylique de la L-alanine (provenant de 3 g (22 mM) de son chlorhydrate). On laisse 1 heure 30 à — 10° et une nuit à 0°. Le tétrahydrofuranne est évaporé et le résidu est repris par le chloroforme ; la suspension sous forme de

gel ainsi obtenue, est filtrée sur filtre plissé et le précipité est copieusement lavé par de nouvelles mises en suspension dans le chloroforme. Le précipité pèse 3,7 g, $F =$ ramollissement : 218° , fusion $221,5-223^{\circ}$ (Rdt 70 %). Les solutions chloroformiques sont purifiées selon la méthode A ; le résidu séché est cristallisé dans le méthylcellosolve redistillé. Poids 0,63 g. $F = 221-223,5^{\circ}$ (Rdt total 82 %). Par recristallisation dans le méthylcellosolve, le point de fusion devient : ramollissement 218° , fusion $222-224^{\circ}$.

Analyse sur le produit séché 16 heures, à 80° :

$$C_{31}H_{40}O_{10}N_4 = 628,66$$

Calculé % :	C	59,23	H	6,41	N	8,91
Trouvé % :		59,39		6,46		8,90

22 - DI-*p*-TOLUÈNE SULFONATE DU DIESTER MÉTHYLIQUE DU *meso*-DAP-BIS(L-ALANINE)

On hydrogène 628 mg du diester méthylique du N, N'-bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala) (1 mM) pendant 2 heures dans un mélange d'acide acétique et de méthanol anhydre en présence de palladium 5 % sur charbon et de 413 mg (2,4 mM) d'acide *p*-toluène sulfonique anhydre (car toute trace d'eau doit être exclue, voir partie théorique)*. La solution est ensuite filtrée et concentrée sous vide ; le résidu est repris plusieurs fois par du méthanol et la solution est concentrée de nouveau. L'huile obtenue se solidifie au dessiccateur, mais le produit étant très hygroscopique, nous avons directement passé à l'étape suivante de la synthèse.

23 - DIESTER MÉTHYLIQUE DU N, N'-BIS(Z-L-ALANYL)- *meso*-DAP-BIS(L-ALANINE)

On dissout 535 mg (2,4 mM) de Z-L-alanine dans 5 ml de tétrahydrofurane, puis on ajoute 0,4 ml de triéthylamine et à -10° , 0,23 ml de chlorocarbonate d'éthyle ; on laisse 15 minutes à cette température et on ajoute la solution de l'ester précédente, préalablement libéré par le chloroforme ammoniacal, et dissous dans le tétrahydrofurane ; la solution est laissée deux heures à -10° et la nuit à $+4^{\circ}$.

Le dérivé peptidique est ensuite traité comme le peptide [21 b]. Le précipité insoluble dans le chloroforme pèse 570 mg (Rdt 74 %), $F =$ ramollissement : 222° , fusion $224-226,5^{\circ}$. Par évaporation du chloroforme, on obtient encore 50 mg (Rdt total 80 %). $F = 205-212^{\circ}$. Par précipitation entre chaud et froid dans le méthylcellosolve, ou par dissolution dans le diméthylformamide et précipitation par l'éther, on obtient toujours des gels et le point de fusion reste à $224,5-226,5^{\circ}$.

(*) L'acide *p*-toluène sulfonique anhydre est obtenu par dissolution à chaud du monohydrate — obtenu dans le commerce — dans du tétrachlorure de carbone, puis distillation du tétrachlorure jusqu'au tiers de son volume, cristallisation à la glacière et filtration : les cristaux sont légèrement violets.

Analyse sur le produit séché pendant 20 heures à 80° :



Calculé % : C 57,64 H 6,53 N 10,90

Trouvé % : 57,71 6,88 10,96

$[\alpha]^{22}_D - 8 \pm 1^\circ$ (c = 2,25, diméthylformamide)

24. - N, N'-BIS(Z-L-ALANYL)-*meso*-DAP-BIS(L-ALANINE)

On dissout 230 mg (0,3 mM) du diester méthylique précédent dans 10 ml de méthylcellosolve en présence de 0,35 ml (0,7 mM) de NaOH 2 N ; on laisse à température ordinaire ; après addition d'eau, on concentre sous vide à 25° jusqu'à 5 ml ; on dilue de nouveau avec de l'eau, on refroidit et on acidifie la solution à Congo positif ; le précipité formé est essoré sur büchner et lavé à l'eau. On obtient 190 mg (Rdt 85 %), F = 192,5-196,5°. Après précipitation dans l'éthanol absolu entre chaud et froid et dans le mélange méthylcellosolve-éther, le point de fusion monte à 194-197,5°.

Analyse sur le produit séché 18 heures à 80° :



Calculé % : C 56,59 H 6,24 N 11,31

Trouvé % : 56,21 6,33 11,30

$[\alpha]^{22}_D - 0,9 \pm 1^\circ$ (c = 2, diméthylformamide)

25 - N, N'-BIS(L-ALANYL)-*meso*-DAP-BIS(L-ALANINE)

On hydrogène 180 mg (0,25 mM) de N, N'-bis-(Z-L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) dans le méthanol contenant un peu d'eau et quelques gouttes d'acide acétique en présence de palladium 5 % sur charbon pendant 2 heures. La solution traitée suivant la méthode C donne un gel. On obtient 93 mg légèrement hygroscopiques (Rdt 81 %). Nous avons effectué sur ce peptide une analyse en acides aminés suivant une méthode que nous décrirons dans cette partie (chapitre III, B-3) ; après hydrolyse acide totale (HCl 6 N ; 18 heures à 110°) nous déterminons le rapport moléculaire de DAP et d'alanine ; pour 0,036 μ M de DAP, nous avons trouvé 0,150 μ M d'alanine, soit une molécule de DAP pour quatre molécules d'alanine.

Analyse sur le produit séché 20 heures à température ordinaire :



Calculé % : C 44,69 H 7,50 N 16,46

Trouvé % : 44,64 7,62 16,00

$[\alpha]^{22}_D - 14,7 \pm 1,5^\circ$ (c = 1,35, HCl 0,1 N)

*
* *

Nous tenons à remercier ici M. J. van Heijenoort qui a étudié la purification du *meso*-DAP et qui a commencé avant nous ce travail de synthèse.

CHAPITRE II

Préparation de peptides non-symétriques du *meso* - DAP

1 - N, N'-BIS-Z-*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

On dissout 600 mg (1 mM) de N, N'-bis-Z-*meso*-DAP-bis(L-Ala) dans 400 ml d'une solution de NaCl 0,5 M en présence de 2,2 mM de NaOH. On ajuste le pH à environ 7,8 par addition d'HCl normal et on ajoute 20 ml d'une solution de carboxypeptidase A* dans du tampon tris 0,02 M, pH 7,5 molaire en NaCl, contenant environ 0,35 mg ** de protéine par ml. Rapport moléculaire enzyme/substrat : 1/5.000. Le mélange est incubé à 37° sous agitation lente. Le dosage de l'alanine libérée montre qu'environ 80 % du substrat sont hydrolysés au bout de 2 heures 30. Après 20 heures d'incubation, l'hydrolyse est complète et une nouvelle addition d'enzyme n'augmente pas la quantité d'alanine libre (figure 6).

La solution est concentrée sous vide jusqu'à un volume de 50 ml et acidifiée par addition d'HCl 6 N jusqu'à réaction Congo positive. Le N, N'-bis-Z-*meso*-DAP(D)-L-Ala précipité est extrait par 200 ml d'acétate d'éthyle. La solution d'acétate d'éthyle est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄ sec et le filtrat est concentré à sec sous vide. Le résidu est cris-

(*) La carboxypeptidase A est une préparation de Worthington Biochemical Corporation (Freehold, New-Jersey).

(**) Les cristaux de carboxypeptidase sont lavés plusieurs fois à l'eau glacée et centrifugés avant d'être dissous.

tallisé dans l'éthanol absolu : on obtient 425 mg (Rdt 82 %) d'un produit cristallin. $F = 175-176^\circ$. $[\alpha]^{21}_D = 5,5 \pm 1,5^\circ$ ($c = 2$, diméthylformamide).

Analyse sur le produit séché pendant 20 heures à 80° :

$$C_{26}H_{31}O_9N_3 = 529,5$$

Calculé % :	C	58,97	H	5,90	N	7,93
Trouvé % :		58,83		5,91		8,07

2 - *meso*-DAP(D)-L-ALANINE

On dissout 200 mg du dérivé précédent dans 15 ml d'un mélange de méthanol-eau (8:2) et la solution est soumise à l'hydrogénolyse en présence de Pd sur charbon à 5 %. Au bout d'une heure, on filtre la solution et on concentre sous vide ; le résidu est dissous dans un peu d'eau et précipité par de l'éthanol ; le précipité, légèrement hygroscopique, est séparé par centrifugation. On obtient 94 mg (Rdt 88 %).

$$[\alpha]^{20}_D = 49^\circ \pm 1^\circ \quad (c = 2, \text{HCl } 0,1 \text{ N})$$

Analyse sur le produit séché pendant 20 heures à température ordinaire et 1 heure à 110° :

$$C_{10}H_{19}O_5N_3, 0,25 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}, 0,5 \text{ H}_2\text{O} = 281,80$$

Calculé % :	C	44,75	H	7,69	N	14,91	OC ₂ H ₅	3,99
Trouvé % :		44,98		7,70		14,61		3,96

Par chromatographie sur papier dans les mélanges de solvants A et B, on obtient une seule tache révélabale à la ninhydrine.

3 - N, N'-BIS(Z-L-ALANYL)-*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

On dissout 70,8 mg (0,094 mM) de bis(Z-L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) dans 25 ml d'une solution de NaCl 0,5 M en présence de 0,18 ml de NaOH N ; on ajuste le pH à 7,6 et on ajoute 2 ml d'une solution de carboxypeptidase A dans du tampon tris 0,02 M, pH 7,5 molaire en NaCl, contenant environ 0,42 mg de protéine par ml. Rapport moléculaire enzyme/substrat : 1,25/5.000. On incube à 40° ; au bout de 18 heures, une nouvelle addition d'enzyme n'augmente plus la quantité d'alanine libre.

La solution est traitée comme dans le cas du dérivé n° 1. On obtient 45 mg (Rdt 71 %), $F =$ ramollissement : 171° , fusion $174-178^\circ$.

4 - N, N'-BIS(L-ALANYL)-*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

On hydrogène 20 mg de N, N'-bis(Z-L-Ala)*meso*-DAP(D)-L-Ala de la façon habituelle dans l'acide acétique-eau (8: 2). Après précipitation dans le mélange eau-alcool, on obtient 10,6 mg (89 %). Après chromatographie sur papier dans le mélange de solvants A et B, on obtient une seule tache révélable à la ninhydrine. Une analyse en acides aminés selon la méthode décrite chapitre III, B-3 montre qu'il y a après hydrolyse acide totale, 0,180 μ M d'alanine pour 0,056 μ M de DAP, soit une molécule de DAP pour trois molécules d'alanine.

5 - *meso*-DAP(D)-L-ALANINE

OBTENU PAR L'ACTION DE LA LEUCINE AMINOPEPTIDASE (LAP)
SUR LE *meso*-DAP-BIS(L-ALA)

A une solution de 452 mg (1,36 mM) de *meso*-DAP-bis(L-Ala) séché 3 heures à température ordinaire et 3 heures à 110° dans 48 ml de tampon tris 0,2 M, pH 8,85, contenant du $MgSO_4$ à une concentration de 0,05 M, on ajoute 2 ml d'une solution de LAP (provenance « Worthington » ; incubée préalablement 1 heure 30 à 40°) contenant 0,5 mg d'enzyme par ml dans du tampon tris 0,04 M, pH 8, et 0,005 M en $MgSO_4$ (activité 40 minutes)*. L'hydrolyse, pendant l'incubation à 40°, est suivie par dosage à la ninhydrine pH 5 (courbe en trait plein de la figure 7) ou par la ninhydrine pH ≤ 1 (courbe en pointillés) (voir chapitre III, A-3). On peut constater ainsi que l'action est terminée au bout de 4 heures 30. L'incubation, avec une nouvelle quantité d'enzyme (0,5 ml) en A, n'augmente plus la coloration.

L'hydrolysate est alors concentré jusqu'à un volume de 10 ml, acidifié à pH 2,3 par HCl concentré et chargé sur une colonne d'Amberlite CG-120 (hauteur 32 cm, diamètre 2,1 cm) préalablement tamponnée à pH 3,25 par du citrate de sodium 0,2 M et chauffée à 50°. L'élution est faite à cette température selon MOORE et coll. [111] d'abord par ce même tampon, puis par un tampon 0,2 M, pH 4,25. On recueille des fractions de 5 ml et on en dose 0,1 ml par la ninhydrine pH 5 (courbe en

(*) *Test d'activité des solutions de LAP* : dans une fiole de 2 ml, on met successivement 0,4 ml d'une solution 0,125 M de chlorhydrate de l'amide de la L-leucine dont le pH a été ajusté à 8 (concentration finale 0,025 M), du $MgSO_4$ donnant une concentration finale de 0,005 M, et 0,015 ml de solution d'enzyme à tester contenant 0,5 mg de protéine par ml ; on complète à 2 ml avec du tampon tris 0,1 M, pH 8,25, et on incube à 40°. L'hydrolyse enzymatique est suivie par chromatographie sur papier dans le mélange de solvants A qui sépare la leucine de son amide ; on détermine ainsi le temps nécessaire pour que la moitié de l'amide soit hydrolysée : ce temps caractérise l'activité de notre solution enzymatique.

trait plein figure 8) et la ninhydrine $\text{pH} \leq 1$ (courbe en pointillés). On voit ainsi que le tampon $\text{pH} 3,25$ élue un seul pic correspondant à l'alanine, et que le tampon de $\text{pH} 4,25$, élue un pic donnant une coloration avec la ninhydrine $\text{pH} \leq 1$ correspondant au *meso*-DAP(D)-L-Ala (chapitre III, B-1).

Les fractions contenant ce dipeptide sont dessalifiées sur une colonne de Dowex 2 (hauteur 30 cm, diamètre 2,5 cm) selon STEIN [112]. L'éluat, par l'acide acétique normal, est concentré sous vide ; le résidu, après un séjour au dessiccateur sur NaOH, est repris dans le minimum d'eau et précipité par l'éthanol absolu sous forme de poudre légèrement hygroscopique. On obtient 250 mg (Rdt après deux recristallisations 75 %, compte tenu des prises effectuées pour les dosages).

Analyse sur le produit séché 5 heures à température ordinaire et 3 heures à 110° :

	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_3$, 0,5 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 284,25$				
Calculé % :	C 46,46	H 7,80	N 14,78	OC_2H_5 7,91	
Trouvé % :	46,27	7,74	14,40	6,32	

Après chromatographie sur papier dans les mélanges de solvants A et B, on obtient une seule tache révéable à la ninhydrine (chapitre III, C), ayant la même valeur de R_F que le peptide n° 2 obtenu par action de la carboxypeptidase.

$$[\alpha]^{22}_D - 50,9 \pm 1,5^\circ \quad (c = 2, \text{HCl } 0,1 \text{ N})$$

6 - *meso*-DAP(D)-(α -L-GLUTAMYL-D-ALANINE)

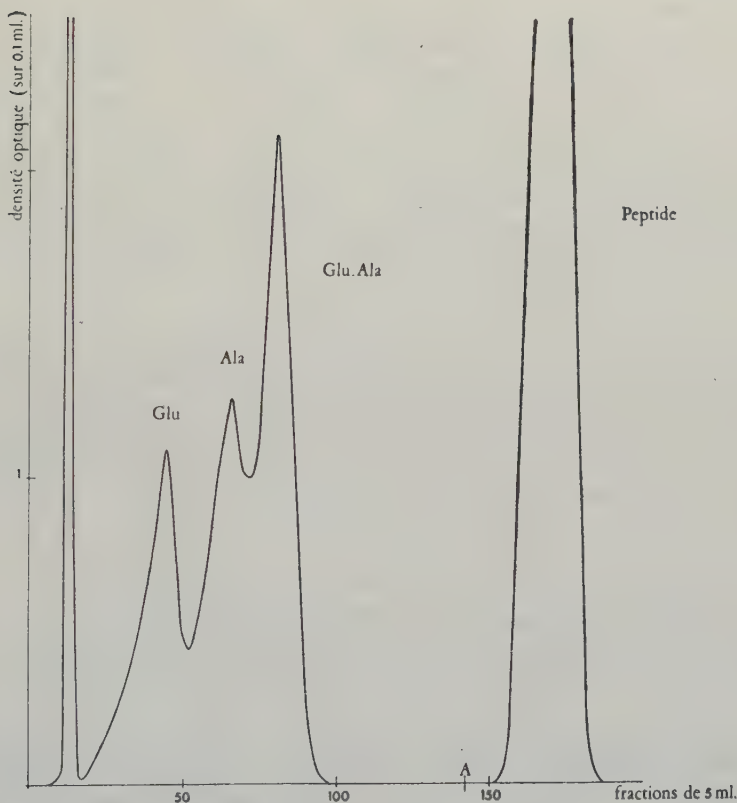
On dissout 601,8 mg de *meso*-DAP-bis(α -L-Glu-D-Ala) (1,03 mM) dans le minimum d'eau et on neutralise la solution par addition de soude N jusqu'à $\text{pH} 7$ environ. On complète alors à 30 ml par du tampon tris 0,2 M, $\text{pH} 8,3$ contenant suffisamment de MgSO_4 pour que la solution soit 0,005 M en Mg^{++} . On ajoute 20 ml d'une solution de LAP, identique à la solution employée pour le dérivé précédent mais d'activité 80 minutes, et on incube la solution à 40° pendant 48 heures. L'hydrolyse, suivie par dosages à la ninhydrine $\text{pH} \leq 1$, paraît terminée ; mais les chromatogrammes dans le mélange de solvants B, révélés à la ninhydrine, semblent montrer encore la présence de pentapeptide. Une nouvelle incubation, avec 5 ml d'enzyme pendant 10 heures, ne change pas la valeur des dosages, mais la tache correspondant au pentapeptide persiste.

L'hydrolysats est alors chargé sur une colonne d'Amberlite CG-120

FIGURE 22

*Séparation sur colonne d'Amberlite CG 120
des produits obtenus par action de la LAP sur le peptide (V)
meso-DAP-bis(α -L-Glu-D-Ala) (hydrolyse prolongée)*

(Voir légende figure 8)



comme précédemment. Le tampon de pH 3,25 (figure 22) élué alors plusieurs pics que nous avons pu caractériser de deux façons :

1. Par chromatographie sur papier après dessalification dans les mélanges de solvants A et B, en présence de témoins ;

2. Par chromatographie du produit de l'hydrolyse acide totale (HCl 6 N, 110°, 18 heures) du produit dessalifié.

Les résultats sont donnés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Caractéristiques et composition des différents pics séparés par chromatographie sur colonne de l'hydrolysate obtenu par action de la LAP sur le peptide meso-DAP-bis(α -L-Glu-D-Ala)

Pic	R _F (A)	R (B) <i>meso</i> -DAP	TÉMOIN POSSÉDANT LE MÊME R _F	COMPOSITION APRÈS HYDROLYSE ACIDE TOTALE
1	Composition identique à celle de l'hydrolysate enzymatique			
2	0,21	2,4	Glu	Glu
3	0,27	3	Ala	Ala *
4	0,19	2,3	Glu-Ala	Glu + Ala

(*) Le R (B) *meso*-DAP du pentapeptide est 3. La tache qui nous semblait être du pentapeptide était donc de l'alanine libérée par hydrolyse enzymatique de la liaison peptidique entre le L-Glu et la D-Ala.

Le tampon de pH 4,25 élue un seul pic qui se colore avec la ninhydrine pH ≤ 1 et qui donne après hydrolyse acide totale, du *meso*-DAP, de l'acide glutamique et de l'alanine. C'est le peptide *meso*-DAP(D)-(α -L-Glu-D-Ala). Les fractions de l'éluate contenant ce tripeptide sont traitées comme dans le cas du peptide précédent. On obtient après deux recristallisations une poudre légèrement hygroscopique pesant 310 mg (Rdt, compte tenu des prises effectuées pour les dosages : 82 %).

$$[\alpha]^{22}_D - 15,2 \pm 1,5^\circ \quad (c = 2, \text{ HCl } 0,1 \text{ N})$$

Après chromatographie dans les mélanges de solvants A et B, on obtient une seule tache révélabale à la ninhydrine (chapitre III, C).

7 - L-ALANYL-(D)*meso*-DAP

Ce peptide a été obtenu de la même façon que le dérivé n° 5 à partir de 450 mg de bis (L-Ala)-*meso*-DAP. La même quantité d'enzyme hydrolyse entièrement la liaison L-L de ce peptide en environ 4 heures 30 (figure 11). Mais, comme nous l'avons montré dans la partie théorique, la liaison L-D de ce peptide peut être hydrolysée, libérant du *meso*-DAP. Aussi, il est nécessaire de passer 850 ml de tampon de pH 3,25 pour éluer le pic 2 (figure 12) correspondant à ce DAP avant d'éluer le dipeptide par le tampon de pH 4,25.

On obtient 245 mg de cristaux en aiguilles légèrement hygroscopiques par cristallisation dans le mélange eau-éthanol absolu (Rdt 75 %).

$$[\alpha]^{22}_D + 37 \pm 2^\circ \quad (c = 2, \text{ HCl } 0,1 \text{ N})$$

Analyse sur le produit séché 16 heures à température ordinaire et 2 heures à 110° :

$$C_{10}H_{19}O_5N_3 = 261,21$$

Calculé % :	C	45,97	H	7,33	N	16,08
Trouvé % :		45,60		7,36		15,74

8 - α -L-GLUTAMYL-(D)*meso*-DAP

Essais préliminaires :

On dissout 24,8 mg (0,055 mM) de bis (α -L-Glu)-*meso*-DAP dans 1 ml de tampon tris 0,2 M, de pH 8,25 en présence de 1,6 mg de $MgSO_4$, de 0,1 ml de NaOH 1,12 N (0,112 mM) et de 0,75 ml d'une solution de LAP (activité 80 minutes). Le volume est ajusté à 2 ml et la solution est incubée à 40°. Les dosages à la ninhydrine pH $\leq$ 1 permettent de tracer la courbe de la figure 23. En A, on ajoute 0,3 ml de la même solution d'enzyme et en B, 0,75 ml. On voit alors que la réaction continue malgré cette incubation de 48 heures.

L'hydrolysate est alors chargé sur une colonne d'Amberlite CG-120 (hauteur 40 cm, diamètre 1 cm); on recueille des fractions de 1 ml dont on dose 0,2 ml par la ninhydrine pH 5 et par la ninhydrine pH $\leq$ 1. La courbe d'élution (figure 14) montre trois pics. La chromatographie sur papier du produit de l'hydrolyse acide totale des pics dessalifiés permet d'en déterminer la composition. Les caractéristiques de ce pic sont résumées dans le tableau V.

TABLEAU V

*Caractéristiques et composition des différents pics séparés par chromatographie sur colonne de l'hydrolysate obtenu par action de la LAP sur le peptide bis(α -L-Glu)-*meso*-DAP*

PIC	R (B) <i>meso</i> -DAP*	COLORATION**	COMPOSANTS	RAPPORT : ninhydrine pH 5***
				ninhydrine acide
1	1,95	violette	<i>meso</i> -DAP et Glu en quantités égales	1,45
2	2,4	violette	Glu	
3	1,05	verte	<i>meso</i> -DAP et Glu en quantités égales	1,15

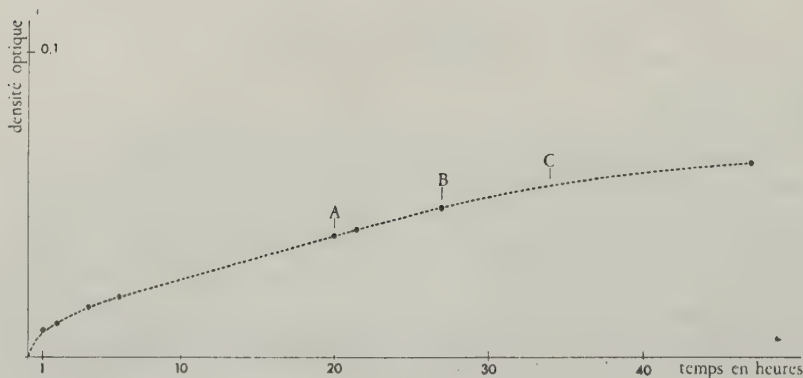
(*) R du bis (α -L-Glu)-*meso*-DAP : 1,13.
meso-DAP

(**) Coloration à la ninhydrine après chromatographie sur papier dans le mélange de solvants B.

(***) Rapport des densités optiques obtenues après réaction à la ninhydrine pH 5 et à la ninhydrine $\leq$ 1 (chapitre III, B-1).

FIGURE 23

Hydrolyse par la LAP du peptide (IV) bis(α -L-Glu)-meso-DAP
(Voir légende figure 7)



Nous sommes donc en présence de deux peptides composés d'une molécule de DAP et d'une molécule de Glu.

Préparation de l' α -L-Glu-(D)meso-DAP.

On dissout 12,8 mg (0,029 mM) de bis(α -L-Glu)-meso-DAP dans 0,6 ml de tampon tris 0,2 M, de pH 8,85 en présence de 0,7 mg de MgSO_4 , de 0,05 ml de NaOH 1,12 N (0,056 mM) et de 0,4 ml de LAP (activité 30 minutes - le rapport activité enzymatique/substrat est trois fois plus grand que dans l'expérience précédente). La solution est alors incubée à 40° ; au bout de 3 heures 30, on ajoute 0,1 ml d'enzyme et on incube encore 1 heure.

L'hydrolysate est alors chargé sur la même colonne que dans l'expérience précédente. On obtient la courbe d'élution de la figure 13 ne présentant qu'un seul pic réagissant à la ninhydrine pH ≤ 1 . Les caractéristiques de ce pic sont les suivantes : R (B) : 1,19 - coloration meso-DAP

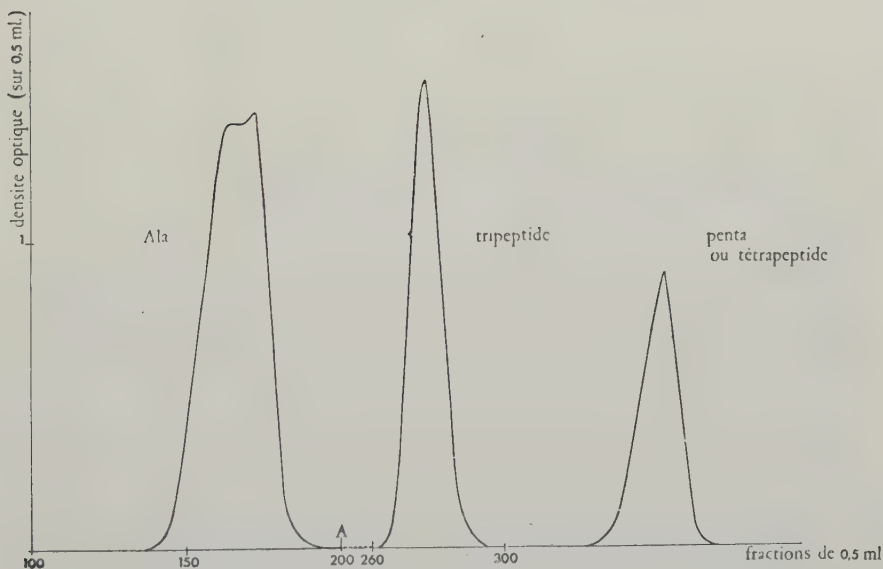
dans ce solvant : violette - composants : meso-DAP et acide glutamique en quantités égales - rapport ninhydrine pH 5/ninhydrine pH ≤ 1 : 2,33.

Nous voyons ainsi que le pic 1 obtenu dans les essais préliminaires, n'existe plus, et que le pic 3, élué par le tampon de pH 4,25, n'a pas les mêmes caractéristiques que le pic élué dans cette deuxième expérience par ce même tampon. Par contre, les caractéristiques de ce nouveau pic sont en accord avec celles obtenues pour le L-Ala-(D)meso-DAP (coloration violette - rapport ninhydrine pH 5/ninhydrine pH ≤ 1 : aux environs de 2).

FIGURE 24

*Séparation sur colonne d'Amberlite CG 120
des produits obtenus par action de la LAP sur le peptide (III)
bis(L-Ala)-meso-DAP-bis(L-Ala)*

(Voir légende figure 8)



La pureté de ce dérivé α -L-Glu-(D)*meso*-DAP, après dessalification, a été étudiée par chromatographie sur papier dans le solvant phénol tamponné à pH 4 [113]; dans ce solvant, contrairement au mélange de solvants A et B, on peut distinguer le bis(α -L-Glu)-*meso*-DAP du α -L-Glu-(D)*meso*-DAP (R_F respectivement de 0,065 et de 0,12). La partie ascendante du pic est entièrement dépourvue de bis(α -L-Glu)-*meso*-DAP; par contre, la partie descendante en contient des traces, comme pouvait le laisser supposer l'épaulement de ce pic en B, mis nettement en évidence dans une nouvelle chromatographie de ce pic (figure 13). Il est certain qu'une chromatographie sur une colonne plus longue permettrait la séparation totale.

Dans l'expérience préliminaire aucun des deux dérivés, réagissant à la ninhydrine pH ≤ 1 n'était le α -L-Glu-(D)*meso*-DAP. Nous n'avons pas cherché à élucider leur structure.

9 - L-ALANYL-(D)*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

Essais préliminaires :

On incube 11,7 mg (0,023 mM) de bis(L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) dans les mêmes conditions que les peptides n^{os} 5 et 7 dans du tampon pH 8,85 0,2 M, en présence de Mg⁺⁺ à une concentration de 0,005 M et de 0,4 ml de LAP (activité 30 minutes). La réaction est suivie par dosages à la ninhydrine pH 5 ; une nouvelle addition de 0,04 ml d'enzyme au bout de 8 heures d'incubation ne semble pas changer la réaction.

On charge alors sur une colonne d'Amberlite CG-120 (hauteur 30 cm, diamètre 1 cm) de la façon habituelle ; on recueille des fractions de 0,5 ml et on dose une de ces fractions sur trois. On obtient la courbe d'élution de la figure 24. Après élution de l'alanine, le tampon de pH 4,25 élue deux pics ; une partie du pic 2 est dessalifiée, puis dissoute dans du tampon tris contenant du MgSO₄ et traitée par 0,04 ml d'une solution de LAP. Mais la chromatographie sur papier de l'hydrolysat ne met en évidence aucune apparition d'alanine. Par contre, une partie du pic 3, traitée dans ces conditions, montre encore une libération d'alanine. L'hydrolyse n'était donc pas terminée.

*Préparation du L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala.*

On dissout 149 mg (0,25 mM) de bis(L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) dans 10 ml de tampon tris 0,1 M de pH 8,3, contenant du MgSO₄ à une concentration de 0,005 M. On ajoute alors 10 ml d'une solution de LAP (activité 55 minutes - 10 fois plus d'enzyme que dans l'expérience précédente). Les dosages à la ninhydrine pH 5 permettent de tracer la courbe de la figure 15. Au bout de 22 heures, la réaction n'étant pas terminée, on ajoute encore 1 ml de la même solution enzymatique ; la réaction est prolongée jusqu'à 48 heures au total. On charge alors sur une colonne (hauteur 30 cm, diamètre 2,5 cm). Après avoir passé 350 ml de tampon de pH 3,25 et 80 ml de tampon de pH 4,25, le dérivé cherché sort dans un volume de 120 ml. Le produit est dessalifié sur Dowex 2 et recristallisé deux fois dans le mélange eau-éthanol absolu. Poids 60 mg (Rdt 75 %).

$$[\alpha]^{20}_D + 24,5^\circ \pm 1,5^\circ \quad (c = 1 \text{ HCl } 0,1 \text{ N})$$

Une analyse en acides aminés, selon la méthode décrite chapitre III, B-3, montre qu'il y a après hydrolyse acide totale, 10,2 μmoles de DAP pour 20,8 μmoles d'alanine, soit une molécule de DAP pour deux molécules d'alanine.

10 - Z-(L)*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

On dissout 396 mg (1,29 mM) de *meso*-DAP(D)-L-Ala dans un minimum d'eau et on ajuste le pH à 11,5 par de la soude 2 N. On ajoute alors sous agitation simultanément goutte à goutte, d'une part 3,6 ml d'une solution 0,25 M de CuCl_2 (0,9 mM) et d'autre part de la soude 2 N de sorte que le pH, lu au pHmètre, reste constamment à 11,5. La solution est alors refroidie dans un bain de glace et on ajoute toujours sous agitation, 1,2 ml (8,5 mM) de carbobenzoxychlorure en 4 portions ; le pH est maintenu à 11,5 pendant toute la carbobenzoxylation. Au bout de deux heures, à 0° et une heure à température ordinaire, le pH reste constant : la réaction est donc terminée. On élimine alors l'excès de carbobenzoxychlorure par 4 extractions à l'éther, puis on acidifie la phase aqueuse et le peptide dicarbenzoxylylé qui précipite, est extrait dans de l'acétate d'éthyle ; on obtient 160 mg de cristaux dont le point de fusion est 160-166°.

On passe alors un courant de H_2S dans la phase aqueuse acide. Le précipité de sulfure de cuivre formé est filtré sur Hyflo et lavé ; le filtrat et les eaux de lavage sont ajustés à pH 4 puis concentrés sous vide jusqu'à 20 ml. On charge alors cette solution sur une colonne de Dowex 2 ($40 \times 3,5$ cm) sous forme basique. Après lavage à l'eau de la colonne, le *meso*-DAP(D)-L-Ala est élué par 5 litres d'acide acétique 0,1 N. On élue ensuite le dérivé monocarbenzoxylylé par de l'acide acétique 2 N (après le passage de 600 ml, il sort dans 375 ml). Cette dernière solution est concentrée à sec ; le résidu est repris par un minimum d'eau. A partir de cette solution saturée, le peptide monocarbenzoxylylé précipite en masse à température ordinaire. Les cristaux sont triturés dans de l'acétone et filtrés. Poids 240 mg, fusion 166-169°.

Pour l'analyse, 30 mg sont dissous dans NH_4OH N ; la solution est concentrée et reprise deux fois par de l'éthanol.

Analyse sur le produit séché 20 heures à température ordinaire :

	$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_7\text{N}_3, \text{NH}_3, 1,5 \text{ H}_2\text{O}$				
Calculé % :	C	49,19	H	7,11	N 12,75
Trouvé % :		49,46		7,29	12,77

11 - *p*-TOLUÈNE SULFONATE DU DIESTER BENZYLIQUE DU Z-(L)*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

On dissout 240 mg (0,6 mM) de Z-(L)*meso*-DAP(D)-L-Ala dans 0,8 ml d'alcool benzylique à chaud en présence de 140 mg (0,75 mM) d'acide *p*-toluène sulfonique ; on ajoute alors 15 ml de tétrachlorure de carbone et on chauffe à reflux dans un appareil de Soxhlet contenant

une cartouche de MgSO_4 . Au bout de 4 heures l'estérification est terminée. Le tétrachlorure est distillé sous vide ; par addition d'éther, le diester précipite. Le précipité est centrifugé ; on obtient 300 mg d'un produit très hygroscopiques (67 %). A partir des eaux mères, il est encore possible d'obtenir un autre lot. L'ester est employé directement pour l'étape suivante.

12 - DIESTER BENZYLIQUE DE LA Z-(L), Z-L-ALANYL-(D)*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

Le couplage est effectué selon la méthode aux anhydrides mixtes décrite dans cette partie, chapitre I, 21 b, à partir de 300 mg (0,4 mM) du dérivé précédent, 111 mg (0,5 mM) de la Z-L-Ala, 0,05 ml (0,5 mM) de chlorocarbonate d'éthyle et 0,07 ml (0,5 mM) de triéthylamine. Les purifications sont faites suivant la méthode A (cette partie chapitre I). On obtient après recristallisation dans l'acétate d'éthyle (240 mg) (Rdt 77 %), $F =$ ramollissement : 145° , fusion $157-162^\circ$.

Analyse sur le produit séché 16 heures à 61° :

$$\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{N}_4 = 780,84$$

Calculé % :	C	66,14	H	6,19	N	7,17
Trouvé % :		65,98		6,28		7,26

13 - L-ALANYL-(D)*meso*-DAP(D)-L-ALANINE

On hydrogène 170 mg du dérivé précédent dans un mélange d'acide acétique et d'eau en présence de palladium sur charbon pendant 2 heures. Après les purifications selon la méthode C (cette partie, chapitre I) on obtient 81,3 mg. Rdt 96 % (calculé avec 3 molécules d'eau de cristallisation).

$$[\alpha]^{20}_{\text{D}} + 23^\circ \pm 1,5^\circ \quad (c = 1, \text{HCl } 0,1 \text{ N})$$

Une analyse en acides aminés selon la méthode décrite chapitre III, B 3, montre qu'après hydrolyse acide totale il y a $0,164 \mu\text{M}$ d'alanine pour $0,084 \mu\text{M}$ de DAP, soit deux molécules d'alanine pour une molécule de DAP.

CHAPITRE III

Caractéristiques Colorimétriques et Chromatographiques des Peptides du *meso* - DAP et leurs applications

A - COLORATION OBTENUE PAR ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES PEPTIDES DU *meso*-DAP EN SOLUTION DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS

1 - COLORATION OBTENUE PAR ACTION DE LA NINHYDRINE A pH 5

MOORE et STEIN [87] ont décrit un dosage colorimétrique des acides aminés en utilisant la réaction à la ninhydrine à 100° (chapitre III, C-2). L'hydrindantine, produit de réduction de la ninhydrine, prenant naissance au cours de la désamination oxydative des acides aminés, réagit pour donner avec le NH_3 libéré, un produit coloré, stable à $\text{pH} > 4$ et absorbant à 570 m μ . Pour obtenir la réaction colorée, il suffit qu'il y ait désamination et non décarboxylation ; la réaction peut donc être aussi utilisée pour doser les peptides.

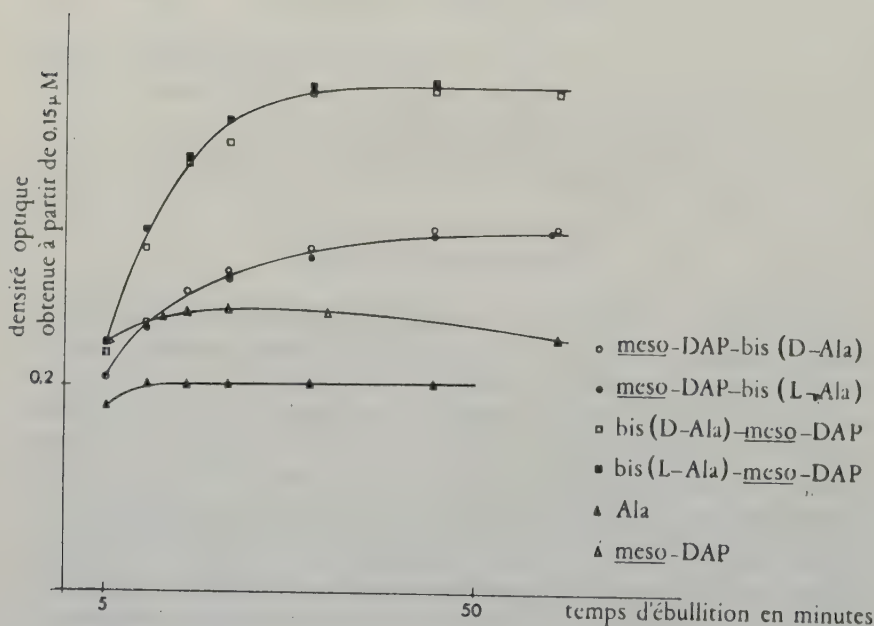
MOORE et STEIN ont déterminé les conditions d'obtention d'une coloration proportionnelle à la quantité d'acide aminé présente dans la solution. Cette réaction est totale avec les α -acides aminés au bout de 15 minutes à 100°, dans les conditions décrites par ces auteurs. Par contre dans le cas des peptides, YANARI [114] a montré que le temps d'ébullition nécessaire pour obtenir le maximum de coloration était souvent plus long que le temps nécessaire aux acides aminés et que l'intensité maximum de cette coloration pouvait passer du simple au double d'un peptide à l'autre. L'intensité maximum de la coloration dépasse alors celle

donnée par l'acide N-terminal seul. YANARI explique ce phénomène par une différence de stabilité des produits venant de la désamination oxydative des groupes α -aminés de ces peptides. Dans certains cas, il y a même une forte différence dans le comportement colorimétrique de deux diastéréoisomères *.

En rapport avec cet article, nous avons étudié le comportement colorimétrique des peptides symétriques diastéréoisomères dont nous avons fait la synthèse : bis(L-Ala)-*meso*-DAP (I) et bis(D-Ala)-*meso*-DAP, *meso*-DAP-bis(L-Ala) (II) et *meso*-DAP-bis(D-Ala). Les résultats sont exprimés dans la figure 25 : les diastéréoisomères réagissent à la ninhydrine avec la même vitesse et ont le même maximum de coloration. Par contre, comme dans les cas cités par YANARI, ces peptides atteignent le

FIGURE 25

*Coloration obtenue par dosage à la ninhydrine pH 5
en fonction du temps d'ébullition*



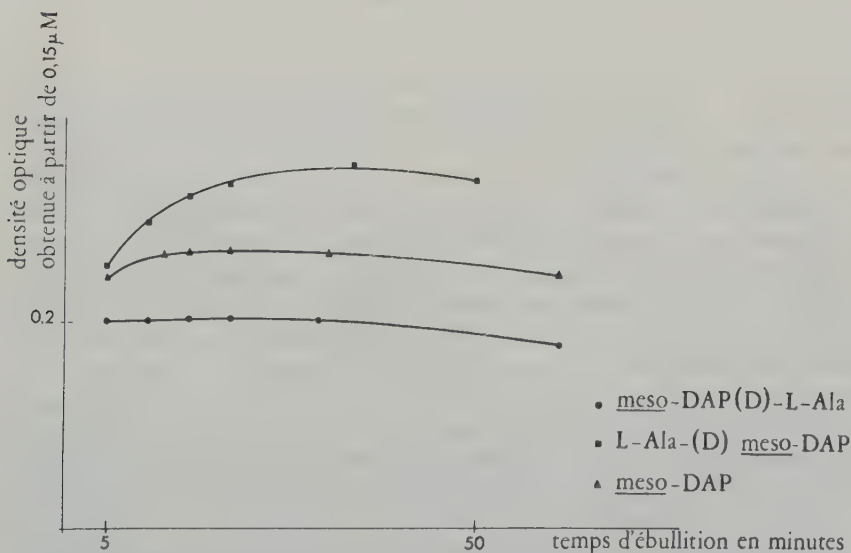
(*) La concentration du mélange réactionnel en solvant organique influence aussi l'intensité de la coloration. Ce phénomène déjà observé par TROLL et CANNAN [115] et MOORE et STEIN [116] a été étudié plus particulièrement par YANARI : il a mis en évidence une influence différente de la concentration en méthylcellosolve sur les deux diastéréoisomères. Dans tous les cas, une faible concentration diminue l'intensité de la coloration ; nos expériences ont toujours été faites à une faible concentration en méthylcellosolve.

maximum de coloration beaucoup plus lentement que les acides aminés correspondants et ce maximum est plus fort que celui obtenu par l'acide aminé N-terminal dont le carboxyle ne serait pas impliqué dans une liaison peptidique (c'est-à-dire pour (I) deux molécules d'alanine et pour (II) une molécule de DAP).

Nous avons fait une étude semblable avec les peptides non-symétriques du *meso*-DAP : L-Ala-(D)*meso*-DAP et *meso*-DAP(D)-L-Ala. Les résultats sont exprimés dans la figure 26. Au bout de 40 minutes d'ébullition l'intensité de la coloration diminue. Cette diminution peut s'expliquer par une décomposition car nous avons remarqué que ces peptides, sous forme de poudre, sont spécialement instables à la chaleur. Le peptide *meso*-DAP(D)-L-Ala, le plus instable, donne rapidement un maximum de coloration inférieur à celui que donne le *meso*-DAP libre. Il y aurait une compétition entre la réaction de rupture de la liaison peptidique entraînant l'augmentation de coloration et la réaction de décomposition, donnant une coloration maximum plus faible et ensuite une diminution de cette coloration.

FIGURE 26

*Coloration obtenue par dosage à la ninhydrine pH 5
en fonction du temps d'ébullition*



2 - COLORATION OBTENUE PAR ACTION DE LA NINHYDRINE A $\text{pH} \leq 1$

CHINARD [117] en 1952, a mis en évidence une autre réaction colorée de certains acides aminés (proline, ornithine...) provoquée par chauffage avec la ninhydrine en milieu acide ; le colorant formé absorbe à 515 m μ . Quelques années plus tard WORK [118] a montré qu'à pH 1, en présence d'acide phosphorique et d'acide acétique, il se forme avec les monoacides diaminés, les acides diaminés dicarboxyliques correspondants et certains autres acides aminés un colorant absorbant à 325 m μ et à 440 m μ . Le coefficient d'extinction du DAP à 440 m μ augmente si le pH descend à 0,3 ; par contre, celui des autres acides aminés diminue. Dans ces conditions, ce dosage devient assez spécifique du DAP. Il faut remarquer cependant que le temps de chauffage doit être de 5 à 10 minutes, car s'il est prolongé jusqu'à 60 minutes, l'ornithine, la lysine, la proline donnent des coefficients d'extinction aussi élevés que celui du DAP. D'après WORK, cette coloration nécessite deux groupements aminés (ou un cycle iminoacide) et un carboxyle en α (le 1,4-diaminobutane et son homologue supérieur ne réagissent pas).

GILVARG [107] a mis au point une méthode de dosage semblable, à 420 m μ , en présence d'HCl concentré. D'après lui, la deuxième fonction amine n'est pas nécessaire puisque la cystéine réagit plus fortement que la cystine et que la lysine. Le dérivé mono-N-succinyl-L, L-DAP qui n'a plus qu'une seule fonction amine libre, réagit lentement [52].

De toute façon il faut retenir de ces études qu'il y a deux caractéristiques de coloration à considérer : l'intensité maximum et la vitesse avec laquelle on l'obtient.

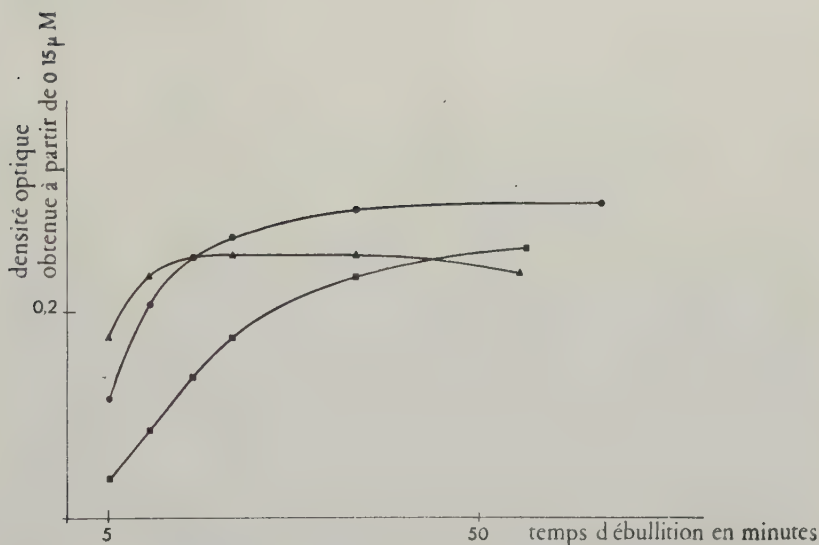
Nous avons examiné différents peptides du *meso*-DAP que nous possédions avec la méthode colorimétrique de GILVARG. Les peptides symétriques ne se colorent pas, ce qui confirme la nécessité d'un carboxyle libre en α d'une fonction amine libre. Mais les dipeptides non symétriques *meso*-DAP(D)-L-Ala et L-Ala-(D)-*meso*-DAP réagissent dans ces conditions comme le montre la figure 27 : le premier se comporte d'une façon très semblable au *meso*-DAP ; par contre, la coloration obtenue avec le second est lente car la deuxième fonction amine est très éloignée. Le peptide L-Ala-(D)-*meso*-DAP(D)-L-Ala ne se colore pas du tout avec le réactif de GILVARG.

On peut conclure que l'éloignement de la deuxième fonction amine diminue la vitesse de réaction et l'éloignement simultané du deuxième carboxyle l'arrête totalement.

FIGURE 27

*Coloration obtenue par dosage à la ninhydrine $pH \leq 1$
en fonction du temps d'ébullition*

(Voir légende figure 26)



3 - CONDITIONS EMPLOYÉES DANS CES RÉACTIONS COLORÉES

Modification du réactif de Moore et Stein [87] :

Dans chaque tube contenant de 0,025 à 0,25 μ moles d'acide aminé ou de peptide dans 0,1 ou 0,2 ml, on ajoute 1 ml de réactif fraîchement préparé contenant 1,2 mg de SnCl_2 , 20 mg de ninhydrine, 0,3 ml de méthylcellosolve déperoxydé et distillé, 0,7 ml de tampon citrate 0,2 M de pH 5. Après développement de la coloration à 100° et refroidissement, on ajoute 10 ml d'un mélange isopropanol ou propanol-eau (1: 1). On lit à 570 $m\mu$ au spectrophotomètre Coleman Jr.

Modification du réactif de Gilvarg [107] :

Dans chaque tube contenant 0,025 à 0,25 μ moles d'acide aminé ou de peptide dans 0,1 à 0,2 ml, on ajoute 0,06 ml d'HCl concentré, 0,4 ml d'une solution de ninhydrine à 5 % dans le méthylcellosolve. Après développement de la coloration à 100° , on dilue par 5 ml d'un mélange de propanol-eau (1: 1). La lecture se fait à 420 $m\mu$ au spectrophotomètre Coleman Jr ou au Beckman.

B - APPLICATIONS

1 - RAPPORT DES COLORATIONS OBTENUES A pH 5 ET A $\text{pH} \leq 1$

Cette possibilité montrée par certains des peptides du *meso*-DAP de se colorer en présence de ninhydrine à pH 5 et à $\text{pH} \leq 1$, permet de déterminer pour chacun d'eux un rapport entre ces deux colorations pH 5 (ébullition 15 minutes)/pH ≤ 1 (ébullition 20 minutes). Ces rapports sont les suivants :

<i>meso</i> -DAP	1,06
<i>meso</i> -DAP(D)-L-Ala	0,76
L-Ala-(D) <i>meso</i> -DAP	2,4
<i>meso</i> -DAP(D)-(α -L-Glu-D-Ala)	0,78
α -L-Glu-(D) <i>meso</i> -DAP	2,32

Il découle de ces résultats que les peptides non-symétriques possédant le *meso*-DAP en position N-terminale ont un rapport de coloration faible, environ de 0,76, c'est-à-dire que la coloration à la ninhydrine pH ≤ 1 est grande par rapport à celle obtenue à la ninhydrine pH 5. Ce rapport est même plus faible que celui obtenu avec le DAP puisque nous avons vu que la réaction à la ninhydrine pH 5 est spécialement faible pour ces peptides. Par contre, les peptides dont le *meso*-DAP est en position C-terminale ont un rapport élevé environ de 2,4.

L'évaluation de ce rapport peut permettre de déterminer si le *meso*-DAP est en position C- ou N-terminale dans les dipeptides non symétriques du *meso*-DAP, obtenus par hydrolyse partielle des mucopeptides. Cette application peut s'étendre, dans certains cas, aux peptides plus longs si un seul des groupements polaires du *meso*-DAP est impliqué dans une liaison peptidique.

La détermination de cette structure des peptides du *meso*-DAP est d'autant plus facile qu'il s'agit de l'évaluation d'un rapport de coloration ; on peut ainsi employer une solution de concentration indéterminée (peptides en solution recueillis à la sortie d'une colonne) ; de plus le dosage n'utilise que 0,025 à 0,25 μ moles de substance.

2 - ETUDE DES HYDROLYSES ENZYMATIQUES

Principes des dosages des produits de l'hydrolyse :

Comme nous l'avons vu précédemment (partie générale, chapitre II A) la carboxypeptidase agit de préférence sur un dérivé acylé. Le dérivé au temps 0 ne réagit donc pas à la ninhydrine pH 5 et, pour suivre la marche de l'hydrolyse, il suffit de doser avec ce réactif la fonction amine qui prend naissance par hydrolyse de la liaison peptidique.

Par contre, pour suivre l'évolution de l'hydrolyse par la LAP, un problème se pose, car les substrats de cet enzyme ont une fonction amine libre et réagissent alors avec la ninhydrine pH 5.

Si les peptides non symétriques, formés par l'action enzymatique, réagissent à la ninhydrine $\text{pH} \leq 1$ il suffit de suivre l'apparition de la coloration jaune au cours de l'hydrolyse. C'est le cas de l'hydrolyse des peptides (II) (V) (I) et (IV) (figure 7, 9, 11, 23). Mais le dérivé non-symétrique prenant naissance peut ne pas réagir à la ninhydrine $\text{pH} \leq 1$ (peptide III) ; il est alors nécessaire de trouver d'autres méthodes. L'hydrolyse d'une liaison peptidique provoque l'apparition d'une nouvelle fonction amine et, par conséquent, devrait augmenter la coloration à la ninhydrine pH 5. Mais nous avons vu que, dans certains cas, la réaction des tripeptides symétriques du *meso*-DAP est plus forte que celle de l'acide aminé terminal et l'hydrolyse ne donne alors qu'une très faible augmentation de la coloration. C'est ainsi que l'hydrolyse enzymatique complète du peptide bis (L-Ala)-*meso*-DAP (I) en L-Ala-(D)*meso*-DAP et alanine se manifeste seulement par une augmentation de la coloration initiale de 25 % lorsque la lecture, à 570 m μ , est faite après 15 minutes à 100°. Pour le peptide *meso*-DAP-bis(L-Ala) (II) cette augmentation est de 40 %.

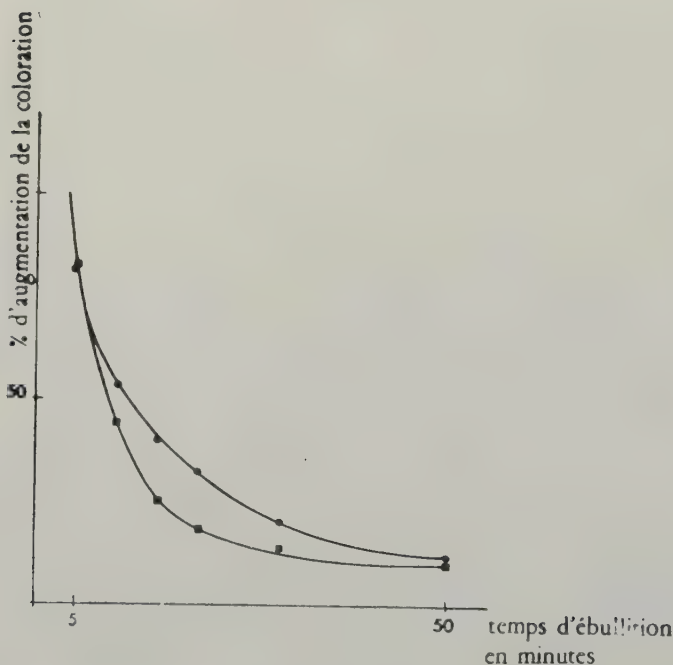
D'après les résultats donnés dans les figures 25 et 26, nous avons établi les courbes de la figure 28 qui représentent le pourcentage d'augmentation de la coloration après hydrolyse complète d'une liaison peptidique en fonction du temps de chauffage avec la ninhydrine pour les peptides (I) et (II). Il devient évident que ce pourcentage est maximum lorsque l'on abaisse ce temps à 5 minutes ; il est alors de 82 %. Nous avons ainsi obtenu les valeurs de coloration représentées dans les courbes 7, 9, 11 et 15 après 5 minutes de chauffage seulement.

A partir du peptide bis(L-Ala)-*meso*-DAP, la LAP libère rapidement une première molécule d'alanine puis très lentement une deuxième molécule. Pour étudier la libération de cette deuxième alanine, nous avons envisagé l'emploi de plusieurs méthodes ; la figure 29, obtenue d'après les figures 25, 26, 27, résume les possibilités de chacune d'elles. Si l'on dose par la ninhydrine à pH 5 après 5 minutes à 100°, l'augmentation de la coloration, provoquée par l'hydrolyse totale de la liaison L-D, sera de 46 %. Un dosage à la ninhydrine à $\text{pH} \leq 1$, après 20 minutes à 100°, montre pour cette hydrolyse une augmentation de 42 %. Ces pourcentages sont trop faibles pour juger d'une légère hydrolyse. Par contre, si l'on dose à la ninhydrine $\text{pH} \leq 1$ après 5 minutes seulement à 100°, l'augmentation de coloration pour l'hydrolyse totale de la liaison L-D est de 340 % ; dans ces conditions, nous avons pu détecter une faible hydrolyse de cette liaison.

FIGURE 28

Variation en fonction du temps d'ébullition du pourcentage d'augmentation de la coloration dosé par la ninhydrine pH 5 lors de l'hydrolyse par la LAP du meso-DAP-bis(L-Ala) et du bis(L-Ala)-meso-DAP

(Voir légende figure 25)

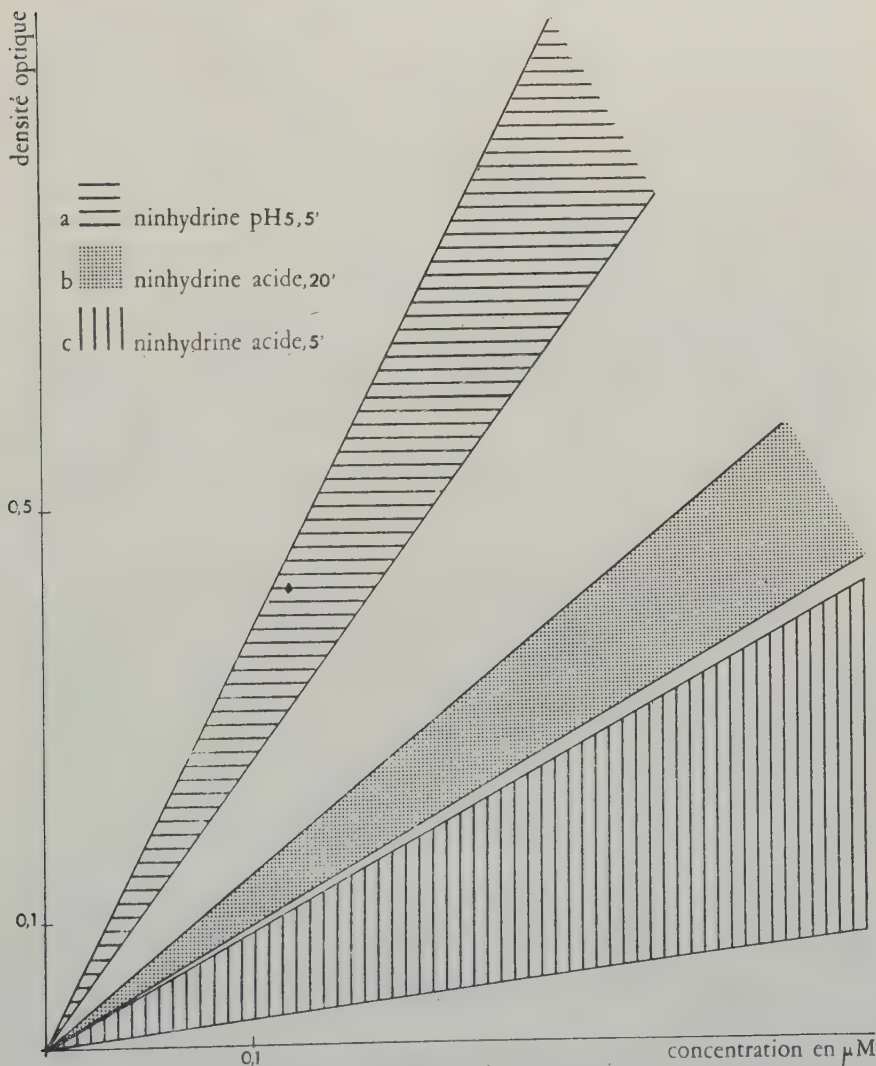


Conditions d'étude de l'hydrolyse par la LAP en fonction du temps :

La méthode est basée sur celle décrite par SCHWARTZ et ENGEL [119]. La solution tamponnée du substrat et celle de l'enzyme sont refroidies dans la glace puis mélangées à cette température, pour déterminer le temps 0 avant toute hydrolyse. Les prises d'essais à des temps variés sont de 0,2 ml ; elles sont diluées par de l'acide acétique N/100 à 10 ml. SCHWARTZ et ENGEL utilisent l'acide picrique ; mais les dosages à 420 m μ empêchent d'utiliser cet acide qui absorbe fortement à une telle longueur d'onde. L'acide acétique, à cette concentration, amène le pH à 4 et inactive ainsi la LAP ; il permet aussi au tampon du réactif de MOORE et STEIN de maintenir le pH à 5. Pour chaque temps d'hydrolyse, des prises d'essai de 0,2 ml sont faites pour les dosages à la ninhydrine pH 5 et à la ninhydrine pH ≤ 1 .

FIGURE 29

*Augmentation de la coloration à la ninhydrine
lors de la libération par la LAP de la deuxième molécule d'alanine*



Elle peut se déduire de la différence entre la courbe montrant la coloration obtenue suivant la concentration à partir d'un mélange équimoléculaire d'Ala et d'Ala-(D) *meso*-DAP et celle obtenue à partir d'un mélange contenant de l'Ala et du DAP dans un rapport moléculaire 2:1 a) par dosage à la ninhydrine pH 5, 5 minutes d'ébullition, elle est de 46 % ; b) par dosage à la ninhydrine pH ≤ 1 , 20 minutes d'ébullition, elle est de 42 % ; c) par dosage à la ninhydrine pH ≤ 1 , 5 minutes d'ébullition, elle est de 340 %.

3 - ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES DU *meso*-DAP PRÉPARÉS

Pour déterminer le rapport moléculaire de *meso*-DAP et d'alanine dans nos peptides, nous les soumettons à une hydrolyse acide totale (HCl 6 N, 110°, 18 heures). Par dosage à la ninhydrine pH ≤ 1 de l'hydrolysât, nous évaluons la concentration en DAP d'après une gamme étalon faite dans les mêmes conditions, car l'alanine ne réagit pas du tout à pH ≤ 1 [118, 107]. Par dosage à la ninhydrine pH 5 de l'hydrolysât, nous évaluons la concentration totale en acides aminés (Ala + DAP) ; suivant une gamme étalon du DAP à la ninhydrine pH 5, nous évaluons la coloration développée par le DAP seul et nous déduisons la coloration due à l'alanine. Une gamme étalon de l'alanine à pH 5, nous permet de trouver la concentration en alanine.

L'acide glutamique ne réagissant pas à la ninhydrine pH ≤ 1 [118, 107], il est aussi possible de déterminer le rapport moléculaire de *meso*-DAP et d'acide glutamique dans un peptide ne contenant que ces deux acides aminés.

C - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES PEPTIDES DU *meso*-DAP

1 - COMPORTEMENT PARTICULIER DANS LE MÉLANGE DE SOLVANTS UTILISÉ PAR RHULAND ET COLL.

RHULAND et coll. [120] ont constaté que l'acide α, α' -diaminopimélique, après chromatographie sur papier dans un mélange méthanol-pyridine-acide chlorhydrique 10 N-eau (80: 10: 2,5: 17,5) se différencie des autres acides aminés de deux manières : d'une part, il donne avec la ninhydrine, une coloration vert-olive qui vire rapidement au jaune et d'autre part, il se dédouble en deux taches distinctes, l'une correspondant à la forme D, D et l'autre à son antipode L, L, la forme *meso* ayant le même R_F que la forme D, D.

Nous avons étudié le comportement dans ce mélange des différents peptides du *meso*-DAP que nous avons préparés. Les résultats sont résumés dans le tableau VI, colonnes 2 et 3.

On constate d'abord que l'apparition d'une coloration verte est caractéristique :

- de la présence sous forme non substituée de deux fonctions α -amines du DAP,
- de la présence d'au moins une fonction carboxyle libre, la seconde pouvant être substituée *.

(*) Il faut noter que les homologues inférieurs ou supérieurs du DAP ne se colorent pas en vert.

Les peptides qui se colorent en vert sur papier sont ceux qui ont un rapport de coloration ninhydrine pH 5/ninhydrine pH ≤ 1 compris entre 0,7 et 1,1 (c'est-à-dire ceux dont la coloration à la ninhydrine pH ≤ 1 est forte).

Cette coloration sur le papier, comme l'évaluation du rapport de coloration, peut donc permettre de déceler, parmi les peptides obtenus par hydrolyse partielle des mucopeptides, la présence de peptides ayant le *meso*-DAP en position N-terminale (ses deux fonctions amines étant libres). L'évaluation du rapport de coloration donne l'avantage d'identifier certains peptides dont le *meso*-DAP est en position C-terminale.

Une autre constatation émane du tableau VI, en ce qui concerne les valeurs de R_F des quatre tripeptides symétriques du *meso*-DAP et de la D et L-alanine deux à deux énantiomorphes. Contrairement aux peptides ayant l'alanine en position N-terminale, les peptides *meso*-DAP-bis(L-Ala) et *meso*-DAP-bis(D-Ala) ayant l'alanine en position C-terminale, migrent à des vitesses différentes. A l'instar de la forme L' L du DAP, c'est le peptide de la L-alanine qui migre le plus. Des résultats semblables ont été obtenus avec la L, L et la D, D-cystathionine [121].

2 - TABLEAU DE R_F

Le tableau VI donne les caractéristiques chromatographiques de tous les peptides du *meso*-DAP que nous avons préparés. La chromatographie sur papier a toujours été faite par la méthode descendante et sur papier Whatman n° 1. Les R_F ont été déterminés dans le mélange de solvants A : n-butanol-pyridine-acide acétique glacial-eau (30: 20: 6: 24) [122] et dans le mélange de solvants B dont nous avons parlé au paragraphe 1. Ce tableau permet aussi de déterminer les possibilités d'utiliser les solvants A et B dans l'étude de l'hydrolyse des peptides (I) à (V) par la LAP. On voit ainsi que :

- le **solvant A** permet seulement de voir l'apparition de l'acide aminé (ou peptide) détaché du *meso*-DAP. La séparation des peptides du *meso*-DAP, produit de départ et produit de l'hydrolyse, n'est à la rigueur possible qu'en développant le chromatogramme pendant 48 heures ;
- le **solvant B** permet de séparer parfaitement tous les composants de l'hydrolysats enzymatique des peptides (I) et (II). Pour le peptide (III), la présence de l'alanine libérée empêche de voir la disparition du substrat. Pour (IV) aucune séparation n'est possible. Pour (V) la disparition du substrat n'est visible que s'il n'y a pas d'apparition d'alanine par hydrolyse de la liaison Glu-Ala.

TABLEAU VI

*Chromatographie sur papier des divers peptides du meso-DAP
et de leurs produits d'hydrolyse par la LAP*

PEPTIDES ET PRODUITS DE LEUR HYDROLYSE PAR LA LAP		SOLVANT A* R _F	SOLVANT B** R <i>meso</i> -DAP	COLORATION A LA NINHYDRINE DANS SOLVANT B
<i>meso</i> -DAP et D, D-DAP		0,08	1	verte
L, L-DAP		0,08	1,25	verte
I	bis(L-Ala)- <i>meso</i> -DAP	0,11	1,8	violette
	bis(D-Ala)- <i>meso</i> -DAP	0,11	1,8	violette
	L-Ala(D) <i>meso</i> -DAP	0,09	1,4	violette
	Ala	0,27	3	violette
II	<i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	0,15	2	violette
	<i>meso</i> -DAP-bis(D-Ala)	0,15	1,7	violette
	<i>meso</i> -DAP(D)-L-Ala	0,12	1,5	verte
III	bis(L-Ala)- <i>meso</i> -DAP-bis(L-Ala)	0,14	3	violette
	L-Ala-(D) <i>meso</i> -DAP(D)-L-Ala	0,12	2,4	violette
	bis(L-Ala)- <i>meso</i> -DAP(D)-L-Ala	0,13	2,8	violette
IV	bis(α-L-Glu)- <i>meso</i> -DAP	0,07	1,13	violette
	α-L-Glu-(D) <i>meso</i> -DAP***	0,07	1,13	violette
	Glu	0,21	2,4	violette
V	<i>meso</i> -DAP-bis(α-L-Glu-D-Ala)	0,09	3	violette
	<i>meso</i> -DAP(D)-(α-L-Glu-D-Ala)	0,08	2,27	verte
	L-Glu-D-Ala	0,19	2,3	violette

(*) Solvant A : n-butanol-pyridine-acide acétique glacial-eau (30: 20: 6: 24) [122].

(**) Solvant B : méthanol-pyridine-acide chlorhydrique, 10 N-eau (80: 10: 2,5: 17,5) [120].

(***) Dans le solvant phénol pH 4 [113] R_F bis(α-L-Glu)-*meso*-DAP : 0,065,
R_F α-L-Glu-(D) *meso*-DAP : 0,12.

*
* *

Au cours du travail décrit dans les deux derniers chapitres, la collaboration technique de Mme F. Contensou-Magrou nous a été précieuse et nous sommes heureux de pouvoir l'en remercier ici.

RÉSUMÉ

Dans la littérature, on ne trouve décrites ni la synthèse de peptides du DAP ni la synthèse de peptides d'acides α , α' -diaminodicarboxyliques de configuration *meso*. Notre premier travail a donc été de faire la synthèse d'une série de dérivés et de peptides dans lesquels le *meso*-DAP est substitué d'une manière **symétrique** soit sur ses deux fonctions amines soit sur ses deux fonctions carboxyles, soit sur les quatre à la fois. Les acides aminés utilisés sont l'alanine et l'acide glutamique qui accompagnent habituellement le *meso*-DAP dans les mucopeptides. Nous avons obtenu les peptides suivants :

bis(L-Ala)-*meso*-DAP (I) et son énantiomorphe,
meso-DAP-bis(L-Ala) (II) et son énantiomorphe,
bis(L-Ala)-*meso*-DAP-bis(L-Ala) (III),
bis(α -L-Glu)-*meso*-DAP (IV).

La synthèse de ces peptides a nécessité la préparation de 24 dérivés peptidiques et peptides non décrits dans la littérature.

La synthèse de ces peptides symétriques nous a permis d'entreprendre alors une étude systématique de l'action de la carboxypeptidase A et de la leucine aminopeptidase du rein de porc sur les liaisons peptidiques dans lesquelles sont impliqués soit le carboxyle, soit l'amine en α du carbone L ou du carbone D du *meso*-DAP.

L'étude de l'action de la **carboxypeptidase** a été faite sur les dérivés N, N'-bis-acylés de (I) et (II), et sur les peptides libres correspondants. Si la L-alanine est en position C-terminale et le *meso*-DAP en position pénultième, seule la liaison L-L (liaison peptidique en α de deux carbones asymétriques L) est hydrolysée à condition que les deux fonctions amines du *meso*-DAP soient acylées. Si, par contre, le *meso*-DAP est en position C-terminale et la L-alanine pénultième, il n'y a pas d'hydrolyse.

L'étude de l'action de la **leucine aminopeptidase** a été faite sur les peptides (I), (II) et leurs énantiomorphes, sur les peptides (III) et (IV) et sur le peptide *meso*-DAP-bis(α -L-Glu-D-Ala) préparé au laboratoire par M. Lefrancier. Toutes les liaisons L-L sont hydrolysées même si

le *meso*-DAP est en position N-terminale. Les liaisons L-D sont très faiblement hydrolysées en présence d'un grand excès de leucine aminopeptidase.

Ces études sur la spécificité des deux enzymes ont permis la préparation des **peptides non symétriques** suivants :

L-Ala-(D)*meso*-DAP,
meso-DAP(D)-L-Ala,
L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala,
bis(L-Ala)-*meso*-DAP(D)-L-Ala,
 α -L-Glu-(D)*meso*-DAP,
meso-DAP(D)- α -L-Glu-D-Ala.

Ces peptides de structure et de configuration déterminées, ont été étudiés dans leur comportement avec la ninhydrine en milieu acide, sur papier et en solution. La coloration obtenue dans ces conditions varie suivant la constitution de ces peptides et, dans certains cas, l'évaluation de cette coloration peut permettre de résoudre des problèmes de structure des peptides résultant de l'hydrolyse partielle des mucopeptides.

A partir du peptide non symétrique *meso*-DAP(D)-L-Ala, nous avons élaboré une nouvelle méthode qui permet de carbobenzoxyler sélectivement la fonction amine en α du carbone L ; nous avons obtenu ainsi le dérivé non symétrique Z-(L)*meso*-DAP(D)-L-Ala. Pour renforcer les preuves que nous avions de sa structure, nous avons, à partir de ce dernier, préparé le peptide L-Ala-(D)*meso*-DAP(D)-L-Ala et nous l'avons comparé avec le même peptide obtenu précédemment par action de la leucine aminopeptidase : les deux peptides sont identiques. L'avantage de ce dérivé est de permettre l'introduction d'acides aminés et de peptides, non seulement sur la fonction amine en α du carbone D, mais aussi sur la fonction amine en α du carbone L. Il est donc possible ainsi d'obtenir toutes les variétés de peptides non symétriques impliquant la fonction amine du *meso*-DAP.

*
* *

Les données sur la structure et la configuration des peptides naturels du *meso*-DAP sont encore incomplètes. Mais si les moyens d'action des **méthodes d'analyse**, agrandis par nos études de spécificité de certaines peptidases, sont encore insuffisants, les **méthodes de synthèse** permettent maintenant d'obtenir des peptides de structure et de configuration assez variées. Il devient dès lors possible de déterminer en les reproduisant certaines structures de ces peptides naturels. Il est incontestable que ces deux voies d'investigation — analyse et synthèse — se complétant l'une l'autre doivent arriver à des résultats positifs.

BIBLIOGRAPHIE

1. WORK (E.) et DEWEY (D.). — *J. Gen. Microbiol.*, 9 (1953) 394.
2. WORK (E.). — *Nature*, 179 (1957) 841.
3. WORK (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 204.
4. WORK (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 400.
5. ASSELINEAU (J.) et LEDERER (E.). — *C.R. Acad. Sci.*, 230 (1950) 142.
6. ASSELINEAU (J.), CHOUKROUN (N.) et LEDERER (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 197.
7. SORENSEN (S.P.L.) et ANDERSEN (A.C.). — *Z. Physiol. Chem.*, 56 (1908) 250.
8. WORK (E.). — *Nature*, 165 (1950) 74.
9. ALLSOP (J.) et WORK (E.). — *Biochem. J.*, 87 (1963) 512.
10. SALTON (M.R.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 512.
11. CUMMINS (C.S.) et HARRIS (H.). — *J. Gen. Microbiol.*, 14 (1956) 583.
12. CUMMINS (C.S.) et HARRIS (H.). — *J. Gen. Microbiol.*, 18 (1958) 173.
13. CUMMINS (C.S.). — *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 103 (1962) 385.
14. PERKINS (H.R.) et ROGERS (H.J.). — *Biochem. J.*, 72 (1959) 647.
15. GHUYSEN (J.M.), LEYH-BOUILLE (M.) et DIERICKX (L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 297.
16. STRANGE (R.E.) et DARK (E.A.). — *Nature*, 177 (1956) 186.
17. KENT (L.H.). — *Biochem. J.*, 67 (1957) 5 P.
18. SALTON (M.R.J.). — *Microbial Cell Walls, Ciba Lectures in Microbial Biochemistry, IV* 1960. J. Wiley and sons ed.
19. WORK (E.). — *J. gen. Microbiol.*, 25 (1961) 167.
20. SALTON (M.J.R.). — *The Bacteria*, vol. I (1960), p. 97, Academic Press, New York et Londres.
21. STROMINGER (J.L.). — *The Bacteria*, vol. III (1962), p. 413, Academic Press, New York et Londres.
22. PERKINS (H.R.). — *Bact. Rev.*, 27 (1963) 18.
23. ROGERS (H.J.). — *J. gen. Microbiol.*, 32 (1963) 19.
24. MEADOW (P.M.), ANDERSON (J.S.) et STROMINGER (J.L.). — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 14 (1964) 382.
25. FREUND (J.) et MCDERMOTT (K.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 49 (1942) 548.
26. WHITE (R.G.), BERNSTOCK (L.), JOHNS (R.G.S.) et LEDERER (E.). — *Immunology*, 1 (1958) 54.
27. WHITE (R.G.), JOLLES (P.), SAMOUR (D.) et LEDERER (E.). — *Immunology*, 7 (1964) 158.
28. ASSELINEAU (J.), BUC (H.), JOLLES (P.) et LEDERER (E.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 40 (1958) 1953.
29. JOLLES (P.), SAMOUR (D.) et LEDERER (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 78 (1963) 342.
30. STEWART TULL (D.E.S.) et WHITE (R.G.). — *J. gen. Microbiol.*, 34 (1964) 43.
31. WHITE (R.G.) et MARSHALL (A.H.E.). — *Immunology*, 1 (1958) 111.
32. ASSELINEAU (J.) et LEDERER (E.). — *Chemistry and Metabolism of Bacterial Lipids, Lipid Metabolism* (1960). Bloch Wiley, New York, ed.
33. TESSER (G.I.) et NIVARD (J.J.F.). — *Rec. Trav. Chim.*, 84 (1964) 53.

34. STROMINGER (L.). — *Comp. Rend. Trav. Lab. Calsberg*, 31 (1959) 181.
35. COMB (D.G.), CHIN (W.) et ROSEMAN (S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 46 (1961) 394.
36. PELZER (H.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 229.
37. MANDELSTAM (P.), LOERCHER (R.) et STROMINGER (J.L.). — *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2683.
38. LILLY (M.D.), CLARKE (P.H.) et MEADOW (P.M.). — *J. gen. Microbiol.*, 32 (1963) 103.
39. ANWAR (R.A.), ROY (C.) et WATSON (R.W.). — *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 41 (1963) 1065.
40. SALTON (M.R.J.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 329.
41. CZERKOWSKI (J.W.) PERKINS (H.R.) et ROGERS (H.J.). — *Biochem. J.*, 86 (1963) 468.
42. PELZER (H.). — *Z. Naturforsch.*, 18 b (1963) 950.
43. MANDELSTAM (M.H.) et STROMINGER (J.L.). — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 5 (1961) 466.
44. JOLLES (P.), NGUYEN-TRUNG-LUONG-CROS (H.) et LEDERER (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 559.
45. ITO (E.) et STROMINGER (J.L.). — *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 210.
46. LEFRANCIER (P.). — *Thèse de 3^e Cycle*, Paris 1963.
47. PELZER (H.). — *Z. Naturforsch.* 18 b (1963) 956.
48. GHUYSEN (J.M.), LEYH BOUILLE (M.) et DIERICKX (L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 286.
49. BRICAS (E.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1961, 201.
50. GREENSTEIN (J.P.) et WINITZ (M.). — *Chemistry of the Amino acids*, vol. 2, p. 763. Ed. J. Wiley, New York 1961.
51. WIELAND (T.) et DETERMANN (H.). — *Angew. Chem., Intern. ed.* 2 (1963) 358.
52. GILVARG (C.). — *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 2955.
53. WORK (E.), BIRNBAUM (S.M.), WINITZ (M.) et GREENSTEIN (J.P.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1916.
54. NORTH (M.B.) et YOUNG (G.T.). — *Chemistry and Industry*, 1955, p. 1597.
- 55 a. VAUGHAN (J.R.) et OSATO (R.L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 676.
- 55 b. VAUGHAN (J.R.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 6137.
56. SHEEHAN (J.C.) et HESS (G.P.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 1067.
57. YOUNG (G.T.). — *Proc. of symph., on methods of peptide synthesis*, Prague, 1958, Coll. of Czech. chem. comm., 24 (1959) 39 (special issue).
58. CURTIUS (T.). — *Ber.*, 35 (1902) 3226.
59. BEN ISHAÏ (D.) et BERGER (A.). — *J. Org. Chem.*, 17 (1952) 1564.
60. BEN ISHAÏ (D.). — *J. Org. Chem.*, 19 (1954) 62.
61. SHIELDS (J.A.), MCGREGOR (W.H.) et CARPENTER (F.H.). — *J. Org. Chem.*, 26 (1961) 1491.
62. WADE (R.), BIRNBAUM (S.M.), WINITZ (M.), KOEGEL (K.J.) et GREENSTEIN (J.P.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 648.
63. BRENNER (M.) et HUBER (W.). — *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 1110.
64. CIPERA (J.D.) et NICHOLLS (R.V.V.). — *Chemistry and Industry*, 1955, 16.
65. McLAREN (J.A.), SAVIGE (N.E.) et SWAN (J.M.). — *Aust. J. Chem.*, 11 (1958) 345.
66. ARNDT (F.). — *Organic Synthesis*, vol. II, p. 165.
67. ERLANGER (B.F.) et BRAND (E.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 3509.
68. HILLMANN (G.). — *Z. Naturf.*, 1 (1946) 682.
69. WINTERSTEIN (A.), HEGEDUS (B.), FUST (B.), BOHNI (E.) et STUDER (A.). — *Hel. Chim. Acta.*, 39 (1956) 229.
70. GROMMERS (E.P.) et ARENS (J.P.). — *Recueil des Travaux chimiques des Pays-Bas*, 78 (1959) 558.
71. GOODMAN (M.) et STUEBEN (K.C.). — *J. Org. Chem.*, 24 (1929) 112.
72. GRASSMANN (W.) et WUNSCH. — *Ber.*, 91 (1958) 462.
73. HANBY (W.E.), WALEY (S.G.) et WATSON (J.). — *J. Chem. Soc.*, 1950, 3229.
74. ZAHN (H.) et SHUSSLER (H.). — *Ann.*, 641 (1961) 176.
75. ANSON (M.L.). — *J. gen. Physiol.*, 20 (1937) 663.
76. ALLAN (B.J.), KELLER (P.J.) et NEURATH (H.). — *Biochem.*, 3 (1964) 40.

77. COX (D.J.), BOVARD (F.C.), BARGETZI (J.P.), WALSH (K.A.) et NEURATH (H.). — *Biochem.*, 3 (1964) 43.
78. NEURATH (H.) et SCHWERT (G.W.). — *Chem. Revs.*, 46 (1950) 69.
79. SMITH (E.L.). — *Adv. Enzymology*, 12 (1951) 225.
80. YANARI (S.) et MITZ (M.A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 1150.
81. FU (S.J.), BIRNBAUM (S.M.) et GREENSTEIN (J.P.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 6054.
82. ROVERY (M.), GABELOTEAU (C.), VERNEJOUL (P. de), GUIDONI (A.) et DESNUELLE (P.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 256.
83. LI (C.H.). — *Adv. Proteins Chem.*, 12 (1957) 306.
84. LI (C.H.) et CUMMINS (J.T.). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 73.
85. SLOBIN (L.I.) et CARPENTER (F.H.). — *Biochem.*, 2 (1963) 22.
86. LABOUESSE-MERCOUROFF (J.). — *Thèse de Doctorat, Paris*, 1957.
87. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
88. SALTON (M.R.J.). — *Abstr. VII Intern. Congr. Microbiol. Stockholm*, 1958, 114.
89. KARA (J.) et KEIL (B.). — *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 23 (1958) 1392.
90. SPACKMAN (D.H.), SMITH (E.L.) et BROWN (D.M.). — *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 255.
91. HILL (R.L.), SPACKMAN (D.H.), BROWN (D.M.) et SMITH (E.L.). — *Biochem. Prop.*, 6 (1958) 35.
92. BINKLEY (F.), ALEXANDER (V.), BELL (F.E.) et LEA (C.). — *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 559.
93. BINKLEY (F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 987.
94. MATHESON (A.T.) et HANES (C.S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 33 (1959) 292.
95. MATHESON (A.T.), BJERRE (S.) et HANES (C.S.). — *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41 (1963) 1741.
96. GLAESSER (D.) et HANSON (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 329 (1962) 249.
97. WOLFF (J.B.) et RESNIK (R.A.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 73 (1963) 588, 613.
98. GLAESSER (D.) et HANSON (H.). — *Naturwissen.*, 50 (1963) 595.
99. SMITH (E.L.) et SPACKMAN (D.H.). — *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 271.
100. SMITH (E.L.) et HILL (R.L.). — *The Enzymes, IV*, page 37, Academic Press, New York et Londres, 1960.
101. SMITH (E.L.) et POGLASE (W.J.). — *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 1209.
102. SMITH (E.L.), SPACKMAN (D.H.) et POGLASE (W.J.). — *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 801.
103. SMITH (E.L.). — *Proc. Intern. Wool Textile Res. Conf., Melbourne*, 1955 C, 407.
104. HILL (R.) et SMITH (E.). — *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 577.
105. HILL (R.L.) et SCHMIDT (W.R.). — *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 389.
106. SMITH (E.L.), HILL (R.L.) et BORMAN (A.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 207.
107. GILVARG (C.). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1501.
108. NOMATO (M.) et NARAHASHY (Y.). — *J. Biochem.*, 46 (1959) 653, 839, 1481.
109. NOMATO (M.), NARAHASHY (Y.) et MURAKAMI (M.). — *J. Biochem.*, 48 (1960) 906.
110. NOMATO (M.) et NARAHASHY. — *J. Biochem.*, 46 (1959) 1645.
111. MOORE (S.), SPACKMAN (D.H.) et STEIN (W.H.). — *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1185.
112. STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 45.
113. MCFARREN (E.F.). — *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
114. YANARI (S.). — *J. Biol. Chem.*, 220 (1956) 683.
115. TROLL (W.) et CANNAM (R.K.). — *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 803.
116. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
117. CHINARD (F.P.). — *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 91.
118. WORK (E.). — *Biochem. J.*, 67 (1957) 416.
119. SCHWARTZ (T.B.) et ENGEL (F.L.). — *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 197.
120. RHULAND (L.E.), WORK (E.), DENMAN (R.F.) et HOARE (D.S.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 4844.

121. BLASCHKO (H.) et HOPE (D.B.). — *Colloque sur la Biochimie du soufre*, CNRS ed. p. 184, 1956.
 122. WALEY (S.G.) et WATSON (J.). — *J. Chem. Soc.*, 1953, 475.
 123. SMITH (I.). — *Chromatographic techniques*. W. Heinemann, Londres, 1958, p. 144.
 124. MCGILLAVRY (C.H.). — *Rec. Trav. Chim.*, 60 (1941) 605.
 125. MORGAN (G.T.) et DREW (H.D.K.). — *J. Chem. Soc.*, 117 (1920) 1456.
 126. NEUBERGER (A.) et SANGER (F.). — *Biochem. J.*, 37 (1943) 515.
 127. DOBBIE (H.), KERMACK (W.O.) et LEES (H.). — *Biochem. J.*, 59 (1955) 240.
 128. DOBBIE (H.) et KERMACK (W.O.). — *Biochem. J.*, 59 (1955) 246.
 129. DATTA (S.S.) et RABIN (B.R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 572.
 130. RABIN (B.R.). — *Metals and enzyme activity*, p. 21. Crook Ed. University Press, Cambridge 1958.
 131. DOBBIE (H.) et KERMACK (W.O.). — *Biochem. J.*, 59 (1955) 257.
 132. RUHEMANN (S.). — *J. Chem. Soc.*, 99 (1911) 792, 1306, 1486.
 133. VAN SLYKE (D.D.), DILLON (R.T.), MCFAYDEN (D.A.) et HAMILTON (P.). — *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 627.
 134. VAN SLYKE (D.D.), MCFAYDEN (D.A.) et HAMILTON (P.). — *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.
 135. PATCHORNICK (A.) et SHALITIN (Y.). — *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1887.
 136. GOLDENBERG (H.) et GOLDENBERG (V.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 29 (1950) 154.
 137. WERBIN (H.) et PALM (A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1382.
 138. BALLS (A.K.), LINEWEAVER (H.) et THOMPSON (R.R.). — *Science*, 86 (1937) 379.
 139. KIMMEL (J.R.) et SMITH (E.L.). — 207 (1954) 515.
 140. JOHNSTON (R.B.). — *Fed. Proc.*, 14 (1955) 232.
 141. McDONALD (C.) et BALLS (A.K.). — *Fed. Proc.*, 13 (1954) 262.
 142. SMITH (E.L.) et PARKER (M.J.). — *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1387.
 143. BRAND (E.) et EDSALL (J.T.). — *Annu. Rev. Biochem.*, 16 (1947) 233.
 144. *Peptides, Proceedings of the Vth European Symposium, Oxford 1962*. G.T. Young, Pergamon Press, Oxford 1963, p. 261.
-

TABLE DES MATIÈRES

NOMENCLATURE DES ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
PARTIE GÉNÉRALE	17
CHAPITRE I. — Synthèse de peptides symétriques du <i>meso</i> -DAP	19
A - Introduction	19
B - Choix des dérivés et des méthodes de couplage	22
C - Difficultés rencontrées	26
1. Elimination des dérivés n'ayant pas réagi	26
2. Possibilités de réactions secondaires	27
3. Difficultés de cristallisation - Formation de gels - Variations de formes solides et des points de fusion	28
Tableau des dérivés peptidiques préparés et leurs caractéristiques..	30
CHAPITRE II. — Etude de la spécificité de diverses peptidases vis-à-vis des liaisons peptidiques auxquelles participe le <i>meso</i> -DAP	33
A - Carboxypeptidase A du pancréas	34
1. Spécificité	35
2. Résultats obtenus	36
3. Discussion des résultats	40
B - Action de la leucine aminopeptidase du rein de porc	42
1. Spécificité	42
2. Résultats obtenus	45
3. Discussion des résultats	53
C - Pronase	55
CHAPITRE III. — Préparation des dérivés du <i>meso</i> -DAP impliquant une seule des fonctions amines ou carboxyles	57
A - Synthèse stéréospécifique d'un dérivé mono-N-acylé du <i>meso</i> -DAP. ..	58
1. Résumé des essais préliminaires de carbobenzoxylation d'un mélange équimoléculaire d'acide aminé et de dipeptide en présence de cuivre	58
2. Carbobenzoxylation sélective de la fonction amine du <i>meso</i> - DAP(D)-L-Ala en α du carbone L	60
B - Recherche d'un enzyme qui hydrolyse les esters du <i>meso</i> -DAP ...	65
1. Comportement de la trypsine vis-à-vis du diester méthylique du <i>meso</i> -DAP	65
2. Action estérasique de la papaïne sur les esters du <i>meso</i> -DAP	66

PARTIE EXPÉRIMENTALE	69
CHAPITRE I. — Synthèse de peptides symétriques du <i>meso</i> -DAP	71
CHAPITRE II. — Préparation de peptides non-symétriques du <i>meso</i> -DAP ..	87
CHAPITRE III. — Caractéristiques colorimétriques et chromatographiques des peptides du <i>meso</i> -DAP et leurs applications	99
A - Coloration obtenue par action de la ninhydrine sur les peptides du <i>meso</i> -DAP en solution dans différentes conditions	99
1. à pH 5	99
2. à pH ≤ 1	102
3. Conditions employées dans ces réactions colorées	103
B - Applications	104
1. Rapport des colorations obtenues à pH 5 et à pH ≤ 1	104
2. Etude des hydrolyses enzymatiques	104
Principe des dosages des produits de l'hydrolyse	104
Conditions employées	106
3. Etude de la composition en acides aminés des peptides du <i>meso</i> -DAP préparés	108
C - Chromatographie sur papier des peptides du <i>meso</i> -DAP	108
1. Comportement particulier dans le solvant utilisé par RHULAND et coll.	108
2. Tableau de R_F	109
RÉSUMÉ	111
BIBLIOGRAPHIE	113

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Biosynthèse de la lysine chez les microorganismes.

Vu et approuvé :

Paris, le 23 Juin 1964

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

Jean ROCHE

A. DEVRUE et Cie
27, Rue J.-J. Rousseau
Paris-1 - Central 54-33

